UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Identificación de uvas comerciales (*Vitis spp*.) genéticamente modificadas (OGM), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa”

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

GABRIELA AMARO RECILLAS

ASESOR:

DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

CO-ASESORA

M. en M. JOSEFINA MORENO LARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimiento y Dedicatoria.

La parra crece libremente, puede llegar a medir mas de treinta metros, esto siempre con ayuda de diversos factores, como el agua, el aire, alimento y sobre todo la acción humana, obteniendo el delicioso fruto de la uva. Esta uva es comestible, así como materia prima para la fabricación de vino y otras bebidas alcohólicas.

Como ejemplo la parra, que necesita apoyo para crecer y regalar al mundo su belleza, considero que mi vida, mis acciones, mi educación y sobre todo la finalización de este proyecto, necesitaron siempre la mano ejemplar de seres humanos ejemplares:

Mi padre y madre quienes, desde el día de mi nacimiento, han hecho hasta lo imposible para que mis raíces, ramas y frutos, lleguen hasta lo más alto. Estaré siempre agradecida por todo lo que fueron y son para mi y reiterando en este momento, orgullosa estoy de ser su hija y de poder dedicarles este, uno de mis mas grandes frutos, que gracias a ellos ha podido ser cosechado con éxito. Mi devoción infinita a los dos, siempre.

Hermanos y hermana, quienes han estado a mi lado a cada instante, siempre apoyando, aconsejando y sonriendo a mi lado. Gracias por no dejarme sola en esta ardua tarea de crecer y madurar. La y los amo.

Todos aquellos que, si bien no nos une la sangre, puedo decir con fervor, que son mi familia. Por que su apoyo, su tiempo su emoción y entrega a cada paso dado, también ha sido determinante en la cosecha de este trabajo. Amigas y amigos, esto se ha logrado gracias a ustedes también, no encuentro forma alguna de agradecerlo.

Para que la parra crezca de forma adecuada, además de la acción humana, necesita el terreno idóneo para poder ser cultivada. Condiciones especificas que ayuden a su crecimiento. Y lo mismo ha sucedido conmigo. Mi universidad ha sido eso y más, me ha llenado de conocimiento, de aprendizaje e invaluable experiencia. Que orgullo sentirme parte de esta otra gran familia.

Profesoras y profesores, cada enseñanza, cada elogio y cada regaño, lo agradezco y atesoro en el alma. Gracias.

A todas y todos, les dedico cada una de las palabras escritas en este trabajo, el cual es el fruto de todo lo que me han brindado. He crecido como una parra y me siento extremadamente feliz por ello, tanto que tomo una copa de vino la levanto al aire, invitándolos a levantar la suya y gritar al unisonó:

SALUD!

Índice

Índice de figuras. V

Índice de tablas. VII

Resumen VIII

Introducción IX

1. Capítulo 1. Antecedentes 1

1.1. Historia, Usos y producción de *Vitis spp*. 1

1.1.1. Orígenes geográficos. 2

1.1.2. Familia, Género y especies de uva. 3

1.1.3. Variedades de uva 4

1.1.4. Fisiología de la *Vitis spp.* 7

1.1.5. Crecimiento de la vid 10

1.1.6. Ciclo vegetativo 11

1.1.7. Composición química 13

1.2. Afectaciones en la vid. 15

1.2.1. Enfermedades de la vid 15

1.2.2. Condiciones climáticas. 18

1.3. Demanda de uva a escala nacional. 19

1.3.1. Zonas y regiones productoras incluidas (a escala nacional) 21

1.3.2. Análisis de la demanda del mercado internacional 21

1.4. Industria Vinícola 22

1.4.1. Producción internacional de vino. 22

1.4.2. Producción nacional de vino. 23

1.5. Organismos Genéticamente Modificados 23

1.6. Controversia por transgénicos 24

1.6.1. Regulación de la bioseguridad en México 25

1.7. Uva Transgénica. 26

1.7.1. Métodos para la transformación genética de la uva 26

1.7.1.1. *Agrobacterium tumenfasis* 29

1.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 29

1.8.1. Etapas 31

1.9. Electroforesis en gel de agarosa 33

2. Capítulo 2. Metodología Experimental 35
2.1. Justificación 35
2.2. Descripción del Cuadro Metodológico 37
2.3. Materiales y métodos. 38
2.4. Extracción de ADN 39
2.5. Cuantificación de ADN 41
2.6. Diseño de primers 42
2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa 43
2.8. Electroforesis en gel agarosa 45
3. Capítulo 3. Resultados y Discusión 47
Resultado O.P. 1: 47
Resultado O. P. 2: 48
Resultado O. P. 3: 49
Resultado O. P. 4: 52
Resultado O. P. 5: 52
4. Conclusiones. 57
Recomendaciones 58
Referencias 59
Anexo 63

Índice de figuras.

Figura 1. Uva de mesa y uva vinícolas. 2
Figura 2. Familia de las *Vitáceas.* 3
Figura 3. Partes de la vid. 8
Figura 4. Partes de uva. 8
Figura 5. Fisiología de los órganos de la vid. 9
Figura 6. Disponibilidad de las variedades en la temporada Mayo- junio de uva. 12
Figura 7. Ciclo de vida de Oídio. 16
Figura 8. Podredumbre gris. 17
Figura 9. Enfermedad de Mildiu. 18
Figura 10. Quemadura de brotes de vid de mesa. 18
Figura 11 Transformación de plantas por *Agrobacterium.* 28
Figura 12 Ampliación de un fragmento de ADN mediante PCR. 30
Figura 13. Desnaturalización de ADN. 31
Figura 14. Alineamiento de Primers. 32
Figura 15. Extensión de cadena de ADN. 33
Figura 16. Especificidad de primers *Vitis.* En gel agarosa al 1%, a 90 volts. (M) Marcador de peso molecular de 1kb. En el carril B muestra en blanco, no contiene ADN (Control negativo). (U) ADN de uva roja S/s. (F) ADN de Fresa. (PLA) ADN de plátano. (PA) ADN de papa. (FRA) ADN de frambuesa. (Z) ADN de zanahoria. 48
Figura 17 Amplificación de los primers de Vitis en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 pb. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra (Control positivo). 49
Figura 18. Amplificación de los primers de uva en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 1 kb. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN, (Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra, (Control positivo). En el carril (1) Uva roja S/s, E.U.A. En el carril (2) Uva red globe C/s, E.U.A. En el carril (3) Uva Perlette S/s, E.U.A. En el carril (4) Uva verde S/s, México. En el carril (5) Uva roja S/s, Chile. En el carril (7) Uva roja C/s, México. En el carril (V1) Uva vinícola “El Salvador”. México. 50
Figura 19. Amplificación de los primers de uva en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 bp. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN,

(Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra, Control positivo. En el carril (8) Uva roja C/s, Chile. 51
Figura 20. Amplificación de los primer de CaMV en gel agarosa al 2.5% a 85v. En el carril (MP) Marcador de peso molecular de 50 pb. En el carril (B) Blanco (Control negativo). En el carril (C+) Control positivo ADN de Maíz transgénico. 52
Figura 21. Amplificación de los primers CaMV en gel agarosa al 2.5% a 60v. En el carril (M) Marcador de peso molecular de 50 pb. En el carril (B) Blanco, sin ADN (Control negativo). En el carril (C+) Control positivo, ADN de maíz transgénicos. En el carril (1) Uva roja sin semilla, E.U.A. En el carril (5) Uva roja sin semilla, Chile. En el carril (6) Uva Negra sin semilla, Chile. 53
Figura 22. Amplificado de los primers de TNOs en gel agarosa 1.5% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 bp. EN el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico, (Control positivo). 54
Figura 23. Amplificación de los primers TNOS en gel agarosa 1.5% a 85v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50bp. En el carril (B) Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico (Control positivo). En el carril (1) Uva roja S/s, E.U.A. En el carril (2) Uva red globe C/s, E.U.A. En el carril (3) Uva perlette S/s, E.U.A. En el carril (4) Uva verde S/s, México. En el carril (6) Uva negra S/s, Chile. En el carril (8) Uva roja C/s, Chile. En el carril (V2) Uva vinícola “Ugni Blanc”, México. 55
Figura 24. Amplificación de los primers TNOs en gel agarosa 2.5% a 85v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 pb. En el carril (B) Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico, Control positivo. En el carril (5) Uva roja sin semilla, Chile. En el carril (7) Uva roja sin semilla, México. En el carril (9) Hoja de parra, México. En el carril (V1) Uva vinícola “El Salvador”, México. 56
Figura 25 Captura de pantalla de página de NCBI para la obtención de primers. 63
Figura 26 Captura de pantalla, selección del gen de *Vitis.* 63
Figura 27 Captura de pantalla, de página para la elección de primers. 64
Figura 28 Captura de pantalla, de elección de la pareja de primers. 64
Figura 29 Captura de pantalla, secuencia especifica de *Vitis.* 65

Índice de tablas.

Tabla 1. Uva de mesa (Fuente: http://aalpum.org/variedades/) 5
Tabla 2. Composición nutricional de la uva por cada 100 g de fruta. (Carranza, 2009) 14
Tabla 6. Nomenclatura, nombre y origen de muestras de uva..... 39
Tabla 7. Características de Primer de *Vitis spp.* 42
Tabla 8. Características de primers del iniciador CaMV..... 43
Tabla 9. Características de primers del terminador TNOs. 43
Tabla 10. Componentes de PCR Directo 44
Tabla 11. Programa para PCR Punto final, con primers de *Vitis spp.*..... 45
Tabla 12. Programa para primer de CaMV y TNOs que se utilizará para PCR. 45
Tabla 13. Cuantificación de ADN..... 47

Resumen

A lo largo de la historia la uva ha sido cultivada, debido a su exquisito sabor, se reconoce por sus increíbles beneficios para la salud, y se considera popular ya que está presente en las dietas en todo el mundo. No solo son consumidas de manera fresca; también es materia prima para ser procesada, como las pasas, jugos, mermelada e incluso enlatados; pero se reconoce más por la producción de vino.

La producción de uva en México representa un 70% por parte del Estado de Sonora, quienes a su vez concentran el 88% del total de las exportaciones. El problema que se enfrentan los productores de uva son las enfermedades físicas, sensible a cambios de clima, plagas, y enfermedades en tallos, ramos y frutos.

Se requieren de medidas agresivas para evitar estos riesgos y mejorar la producción. La utilización de fungicidas elimina plagas siendo útil al principio, pero deja de serlo después de cierto tiempo, afectando a la producción y al valor de está. Los países con mayor tecnología han optado por la trasformación genética en las uvas, obteniendo mejores resultados y resaltando la entrada económica. Esta opción genera debate entre científicos, consumidores, ambientalistas y productores que se preocupan por lo que consumen.

Para identificar los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) se requiere de métodos puntuales. En esta investigación se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN. El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde.

Las muestras se obtuvieron aleatoriamente, estas se analizaron en PCR con primers transgénicos CaMV 35S y TNOs, que es promotor y terminador respectivamente. Los resultados fueron positivos en algunas de estas muestras, siendo una mexicana, lo que resulta raro ya que ante la lista de autorización de la Secretaria de Salud (SSA) que permite el cultivo genéticamente modificado, no está presente la *Vitis spp*.

Introducción

La Vid es considerada como uno de los principales cultivos de frutales en el mundo sobre la base de hectáreas cultivadas y valor económico. Las uvas se utilizan no sólo para el vino, sino también para la fruta fresca, frutos secos, y la producción de jugo. (Bouquet *et al*., 2007). Las investigaciones efectuadas por distintas universidades han probado que el jugo de uva limpia las arterias, permite una mejor circulación de la sangre y protege al Corazón. (Reardon y Troxler, 2007).

Sonora es el principal estado productor de uva de mesa en México, con una producción anual de 15 millones de cajas de 8.2 kg cada una, destinadas principalmente al mercado de exportación, con la ventaja competitiva de producir cosecha más temprana que California, E.U.A., lo cual ha motivado el establecimiento de nuevos viñedos en esta región y el uso de tecnología que ayude a forzar a las vides a obtener cosechas más precoces, inocuas y sostenibles. Las variedades más ampliamente plantadas son Flame Seedless, Perlette, Superior y en menor proporción Red Globe y Black Seedless (Vázquez, 2011).

Actualmente se ha aplicado la biotecnología para obtener varias características, por ejemplo: mayor producción de uva, contenido de azúcar, color y para que no contengan semillas. Se utilizaron genes que codifican para anticongelante, superoxido dismutasa (SOD) o para la proteína de unión al hierro de la ferritina (Nagata *et al*., 2007).

Se tienen problemas en los cultivos de la uva en varios países por algunos patógenos que afecta la producción por lo que se han utilizado organismos genéticamente modificados a las variedades de uva para la resistencia de hongos y levaduras, por ejemplo: Australia utiliza genes para regular el desarrollo en flores, mayor producción de frutos y síntesis de antocianinas; en Francia emplearon el gen para la resistencia de virus; en EUA introducen genes para la resistencia de *Agrobacterium, Nepovirus, Botrytis, Xillela, Closterovirus* y para uvas sin semillas; por último Canadá para que sean tolerantes al frio (Nagata *et al.*, 2007).

Un organismo genéticamente modificado es aquel en el que el material genético, el ADN, ha sido alterado artificialmente, no por cruzamiento natural sino a través de la tecnología del ADN recombinante. Esta metodología permite que genes particulares, seleccionados especialmente, sean transferidos de un organismo a otro. Los genes que contienen la información para un

producto de interés pueden ser aislados y luego introducidos en bacterias u otros tipos celulares con el fin de obtener el producto codificado por ese gen en la nueva célula. (Marín *et al.*, 2001). La principal ventaja de la transformación genética es mejorar los cultivos de propagación vegetativa. Estas mejoras incluyen genes de resistencia a diversos virus, hongos o insectos, o genes que afectan a las características pre o post-cosecha, incluyendo la maduración, color y sabor. Los resultados se basan en el desarrollo de procedimientos específicos de genotipo para la producción de brotes en explantes que han sido infectados con cepas de *Agrobacterium* que albergan vectores de ADN recombinante. (Baribault *et al.,* 1990).

Es indispensable que en nuestro país las propuestas de desarrollo en el área de biotecnología sea la solución de los problemas específicos del campo mexicano, así fomentar una biotecnología congruente a la situación de los agroecosistemas y las demandas sociales y económicas del sector agropecuario mexicano. (Bolívar, 2007). Frente a esta situación, se requiere un sistema de transformación fiable para un transgénico en la mejora de la vid. Hay 2 métodos científicos que se utilizan en la actualidad para detectar modificaciones genéticas. Una es ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), que estudia la presencia de proteínas específicas de la unión entre un antígeno expresado y un anticuerpo diana; el otro es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), basada en la detección de secuencias nuevas de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos muestran la ausencia o presencia del organismo genéticamente modificado en la muestra (Querci *et al.,* 2007).

Por lo cual se realiza este trabajo con el fin de conocer si en nuestro país existen transgénicos específicamente en las uvas y con el método de PCR, ya que es una técnica eficiente, sensible ya que con mínimas cantidades de ADN se logra tener un resultado. Y con esto lograr que las autoridades gubernamentales realicen una ley o norma donde etiqueten los productos que contienen o están compuestos por OMG.

1. Capítulo 1. Antecedentes

1.1. Historia, Usos y producción de *Vitis spp*.

La vid es un arbusto caducifolio que pertenece a la familia de las Vitáceas (*Vitaceae*). Su nombre científico es *Vitis vinífera* y se encuentra distribuida por el centro y sureste de Europa y suroeste de Asia. (Pérez, 2003). La uva es una de las plantas cultivadas más antiguas que se conocen. La especie *Vitis vinífera*, de la cual se derivaron la mayoría de las variedades cultivadas y conocidas, es originaria de la región comprendida entre los mares Negro y Caspio de Asia (Morales y Morales, 1995).

A lo largo de la historia, han existido ciertos productos agropecuarios que el hombre se ha procurado para su dieta, y han estado presentes, tanto en las mesas más humildes como en los grandes banquetes; en el Imperio Romano, los banquetes de los emperadores estaban pletóricos de una gran variedad de frutas, entre ellas, las uvas. La misma situación se podía observar en las bodas que se realizaron antes de Cristo, hasta nuestros días. Debido a su amplia aceptación, tanto como alimento directo, por su valor nutritivo, por su gran utilidad para obtener otros derivados, el cultivo de la uva ha tenido gran importancia para algunos países, los que destinan grandes recursos financieros y humanos para el desarrollo y consolidación del sector, ya sea con el fin de abastecer su mercado interno, o como fuente de divisas mediante el comercio internacional (Salazar, 2011).

El origen de la vid en nuestro continente, y específicamente en el país, se remota a la época colonial, ya que la vid europea fue traída por Cristóbal Colón durante su segundo viaje, en el año de 1493 (Salazar, 2011).

Esta actividad agrícola ha generado una mitología entre la vitivinicultura. El vino formó parte desde muy temprano de los ritos religiosos: Dionisio, Baco, el judaísmo y el Cristianismo, adoptaron al vino como símbolo de vida, muerte y resurrección. (Lanzariní, & Mangione, 2009).

Los pueblos semitas fueron quienes hicieron posible la domesticación de la *Vitis vinífera*. La variedad *Vitis silvestre* se encuentra en todos los continentes. Sin embargo, fue en las primeras aldeas del mundo, donde alguna persona quizá, en forma casual, bebió el jugo fermentado de uvas silvestres que había recogido y almacenado en una vasija de cerámica.

Las uvas se consumen de varias formas, como por ejemplo frescas, en cocteles, jugos, concentrados, jaleas, pasas, vinos y brandis. De la producción total mundial de uvas, el 10% se consume como fruta fresca, el 10% se usa para la producción de pasas y el 80% para la producción de vinos. Ver fig. 1 (Morales y Morales, 1995).

Figura 1. Uva de mesa y uva vinícolas.

Sonora produce alrededor del 95% de la uva en México; en uva de mesa, produce el 74%, en uva pasa este porcentaje alcanza el 98%, mientras que en uva industrial llega al 74%. Así, del total de hectáreas cosechadas en el estado el 47% corresponde a uva de mesa, 35% a uva industrial y el 18% uva pasa (Vázquez, 2011).

La Fundación Produce Sonora, A.C., propone como caso exitoso a la Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa (AALPUM), que agrupa a productores altamente eficientes, que han demandado mejoras en los sistemas de producción de la uva y que actualmente hacen del estado de Sonora el principal productor de uva de mesa en el país (Vázquez, 2011).

1.1.1.Orígenes geográficos.

En el primer milenio antes de Cristo, en el norte de la Mesopotamia, la ciudad de Nínive, capital de los asirios, adquirió fama a causa de sus vinos, pero al sucumbir en manos del nuevo Imperio Babilónico, en el siglo VII a.C., el cultivo de la vid decreció. Hay evidencias de que Babilonia importaba vino desde Armenia en toneles de madera (Lanzariní y Mangione, 2009).

Desde la Mesopotamia, el cultivo de la vid se extendió hacia el Cercano Oriente y hacia el Mediterráneo a través de las culturas babilónica, fenicia, griega, romana, etrusca y cartaginesa. En el segundo milenio la vitivinicultura llegó a China y Japón (Lanzariní y Mangione, 2009).

Las principales regiones productoras de uva en el mundo son aquellas zonas de clima mediterráneo sobresaliendo los países Italia, China y Estados Unidos, en el cual Italia ocupa el primer lugar como productor de uva, con una producción promedio de 81,500 millares de quintales (Salazar, 2011).

1.1.2.Familia, Género y especies de uva.

La vid pertenece a la familia de las *Vitáceas.* Las plantas de esta familia son arbustos trepadores, a modo de lianas, de tallo frecuentemente sarmentoso, aunque a veces herbáceo, que presentan zarcillos opuestos a las hojas. La familia comprende 19 géneros, uno de ellos es el género *Parthenocissus* al que pertenecen las viñas vírgenes (*P. tricuspidata* y *P.quinquefolia*), originarias de Asia y de América del Norte, y el género *Vitis,* originario de las zonas cálidas o templadas del hemisferio Norte (América, Europa y Asia). Ver fig. 2 (Reynier, 2002).

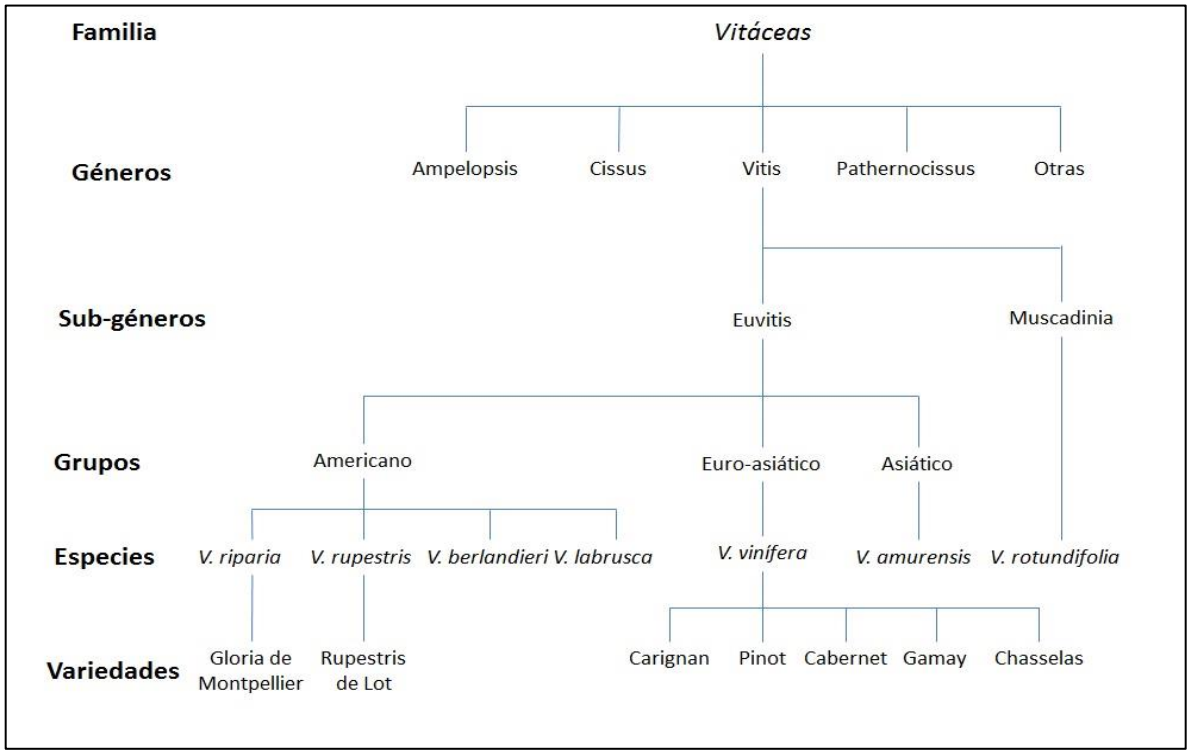


Figura 2. Familia de las *Vitáceas.*

El género *Vitis*, al cual pertenecen las vides cultivadas, está dividido en dos secciones o subgéneros: *Euvitis* y *Muscadina*.

El subgénero *Muscadinia* comprende tres especies originarias del Sureste de los Estados Unidos y de México. Solamente la especie *Vitis rotundudolia* es cultivada en estas regiones. El subgénero *Euvitis* comprende las verdaderas vides que pueden ser clasificadas según su distribución geográfica natural (Reynier, 2002).

En América del Norte varias especies, la *V.labrusca* resistente a la filoxera, han sido utilizadas como portainjertos. Entre las más importantes, se citan: *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*, *Vitis cordifolia*, *Vitis labrusca*, *Vitis candicans*, *Vitis cinérea*. *Vitis labrusca* presenta aptitudes bastantes próximas a *Vitis vinífera*: sensibilidad a filoxera, buena respuesta al estaquillado y al injerto, buena adaptación a condiciones climáticas templadas; se distingue por una mayor resistencia al frío, también a las enfermedades de la parte vegetativa (Reynier, 2002).

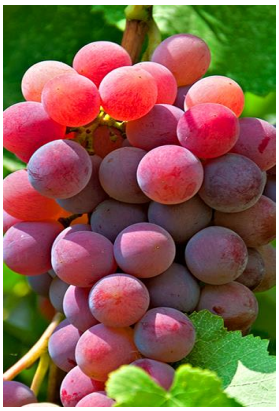
1.1.3.Variedades de uva

La variedad es el término utilizado por el viticultor para designar un cultivar de la vid. Es una variedad constituida por un conjunto de individuos que tienen en común caracteres morfológicos y tecnológicos bastantes parecidos como para designarlos bajo el mismo nombre (Reynier, 2002).

Uno de los factores determinantes en la calidad y bondad dependen de la variedad de uva utilizada. Esta es una breve y modesta reseña de las distintas variedades de uvas. No pretende ser esencial, solo prudentemente modesta e interesadamente útil (Nicolás, 2008).

Las destinadas a la elaboración del vino de mesa deben presentar acidez relativamente alta y un contenido moderado en azúcares; las uvas usadas para elaborar ciertos vinos dulces han de ser ricas en azúcares y algo ácidas. La uva de mesa debe tener acidez baja y ser pobre en azúcares, así como cumplir ciertas normas en cuanto a tamaño, color y forma (Ver tabla 1). Las uvas usadas para preparar jugos y jaleas tienen sabor intenso, acidez elevada y contenido moderado de azúcares. Las uvas pasas más apreciadas son las obtenidas a partir de variedades sin semillas, de acidez baja y ricas en azúcares. Las variedades europeas se consideran superiores a las del este estadounidense para elaborar vinos de mesa, como frutos de postre y de mesa y para elaborar

pasas, mientras que las variedades norteamericanas se prefieren para obtener jugos y jaleas (Pérez, 2003).

Tabla 1. Uva de mesa (Fuente: http://aalpum.org/variedades/)		
NOMBRE	IMAGEN	DESCRIPCIÓN
Perlette		• Las bayas son redondas, sin semillas, son de color verde ligeramente amarillento. • Cosecha: cont. Min. De azúcar 15.5 °Brix.
Flame seedless		• Las bayas son sin semillas, de color rojo suave a brillante, forma esferica. • Cosecha: cont. min. azúcar de 16° brix.
Red Globe		• Originaria de Davis California. • Las bayas son con semillas muy grandes de un calibre de 24-26 mm. Forma redonda, de color rojo. • No se maneja con una densidad de plantación adecuada.

Sugraone o Superior		• Racimo grande y alargado • Cosecha de 15° a 15.5° Brix • Bayas grandes, sin semillas, alargadas, ovales. Piel verde claro. • La baya presenta un color de verde claro a verde amarillento.
Black Seedless		• Bayas: sin semillas • Color: negro • Forma: cilíndrica • Ligeramente crocante • Piel relativamente gruesa • Sabor: agradable • Cosecha: 16.2° Brix

Las variedades más conocidas para la elaboración de vino son:

Merlot, Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Malbec, Chenin Blanc, Trebbiano y Sauvignon Blanc, entre otras menos conocidas, pero complementarias (ViVai, 2013).

- MALBEC. Se extendió en primer lugar por la zona de Burdeos. Variedad oscura y rica en taninos, produce rendimientos moderados y por tanto, vinos tintos de un gran carácter y con un buen potencial de envejecimiento.

- CABERNET SAUVIGNON. Originaria de Burdeos, se ha elevado a nivel internacional y se ha convertido en una de las variedades de tinto más apreciadas. Los buenos Cabernet presentan mucha fuerza y estructura y envejecen de manera excelente.

- TEMPRANILLO. Variedad de primera calidad en España. Es típico el carácter aromático y muy afrutado de estos vinos. Se aprecia de forma especial su gran potencial de

maduración en madera. Los taninos se caracterizan por su delicadeza y la dulzura, y en madera desarrollan una suavidad considerable.

- CHENIN BLANC. Prestigiosa cepa de Anjou, en el Loira. Según la añada, la maduración y el propósito, puede dar una gran gama de vinos que van desde espumosos de una sequedad extrema, hasta cosechas bien maduras y con unos restos dulces muy concentrados.

- SAUVIGNON BLANC. Emparentada con la Cabernet, muestra su gran clase. Como vino varietal empezó su carrera en el Loira, con una acidez fresca y un matiz mineral inimitable. De aromas vegetales a hierba que desarrolla cuando se vendimia pronto, se convierte, en una de las variedades blancas de moda.

- MERLOT. originaria de la región de Burdeos, donde es la variedad más cultivada. El vino monovarietal de Merlot se caracteriza por su finura y suavidad, sin dejar de ser aromático y carnoso. Es de color rubí muy intenso, de graduación mediana y envejece rápidamente sin perder calidad.

- TREBBIANO. Es una de las variedades de más amplia difusión mundial. Se cultiva especialmente en la región de Toscana (Italia). También conocida como Ugni blanc y Saint Emilion en Cognac (Francia). Se obtienen vinos de aspecto brillante, color amarillo limón con reflejos verdosos, vivaces y ágiles. Sus aromas son levemente intensos pero agradables y limpios. En la boca es curiosamente seco, de cuerpo medio.

1.1.4.Fisiología de la *Vitis spp.*

En la vid se distinguen dos partes (figura 3). La subterránea, formada por las raíces de mayor o menor grosor, cuyas extremidades más finas y jóvenes forman la cabellera. En la parte aérea se diferencian el tronco, los brazos y los sarmientos, por una parte, y los brotes, hojas, frutos y zarcillos, por otra. Esta parte aérea es lo que generalmente se denomina “canopia” (Lanzariní y Mangione, 2009).

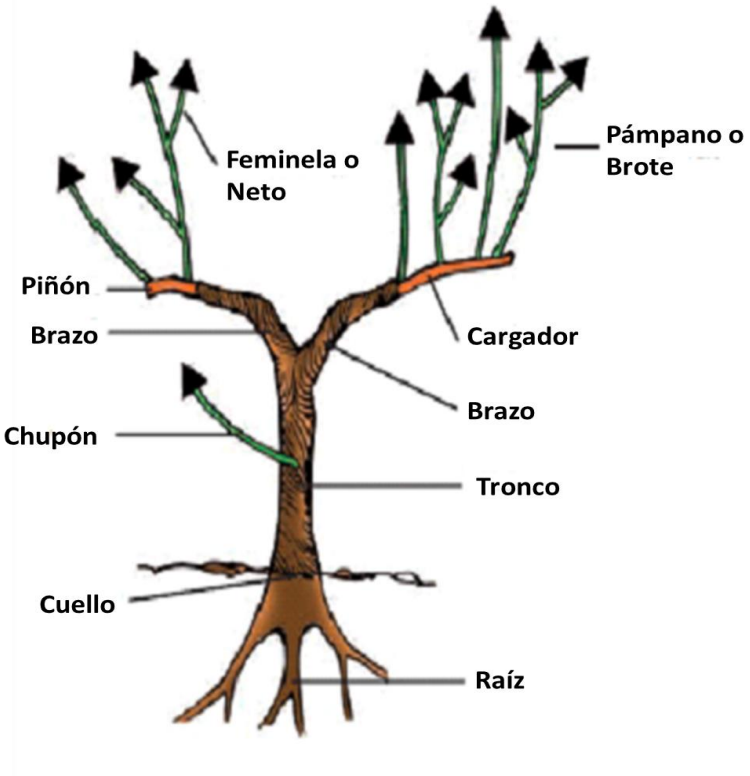


Figura 3. Partes de la vid.

Apenas brota la yema latente se origina un brote que en la vid se suele denominar pámpano (Ver fig. 3). El pámpano se convierte en sarmiento después que se lignifica, es decir, cuando adquiere las características de madera; este proceso se denomina maduración del sarmiento o agostamiento (Lanzariní y Mangione, 2009).

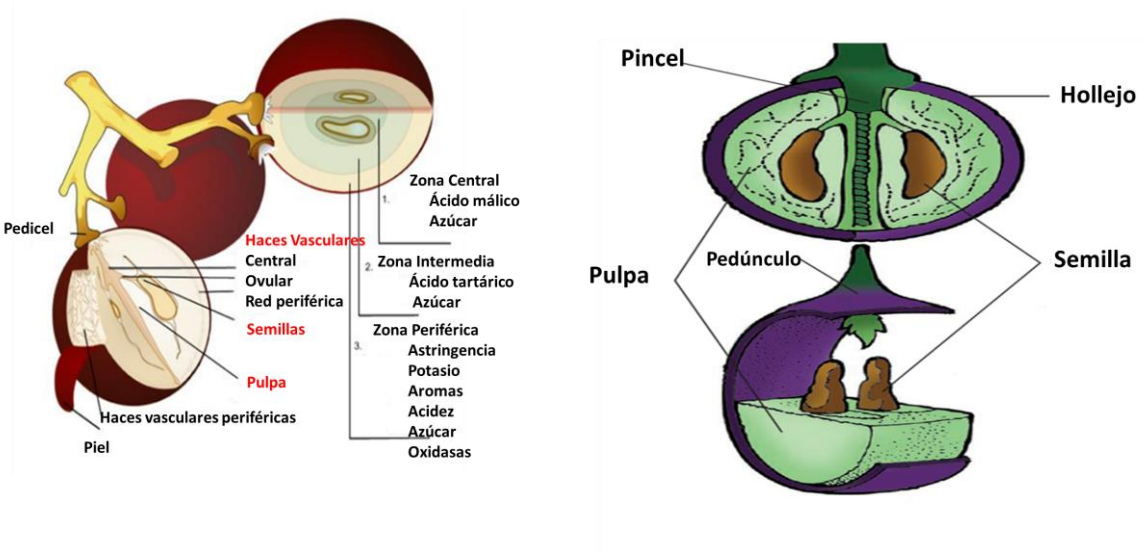


Figura 4. Partes de uva.

Las uvas se hayan agrupadas en racimo, unidas al raspón por peciolos individuales. El raspón y los granos son los componentes fundamentales del racimo. Los aromas de la uva están almacenados en la piel (ver fig. 4) (Blouin y Guimberteau, 2012).

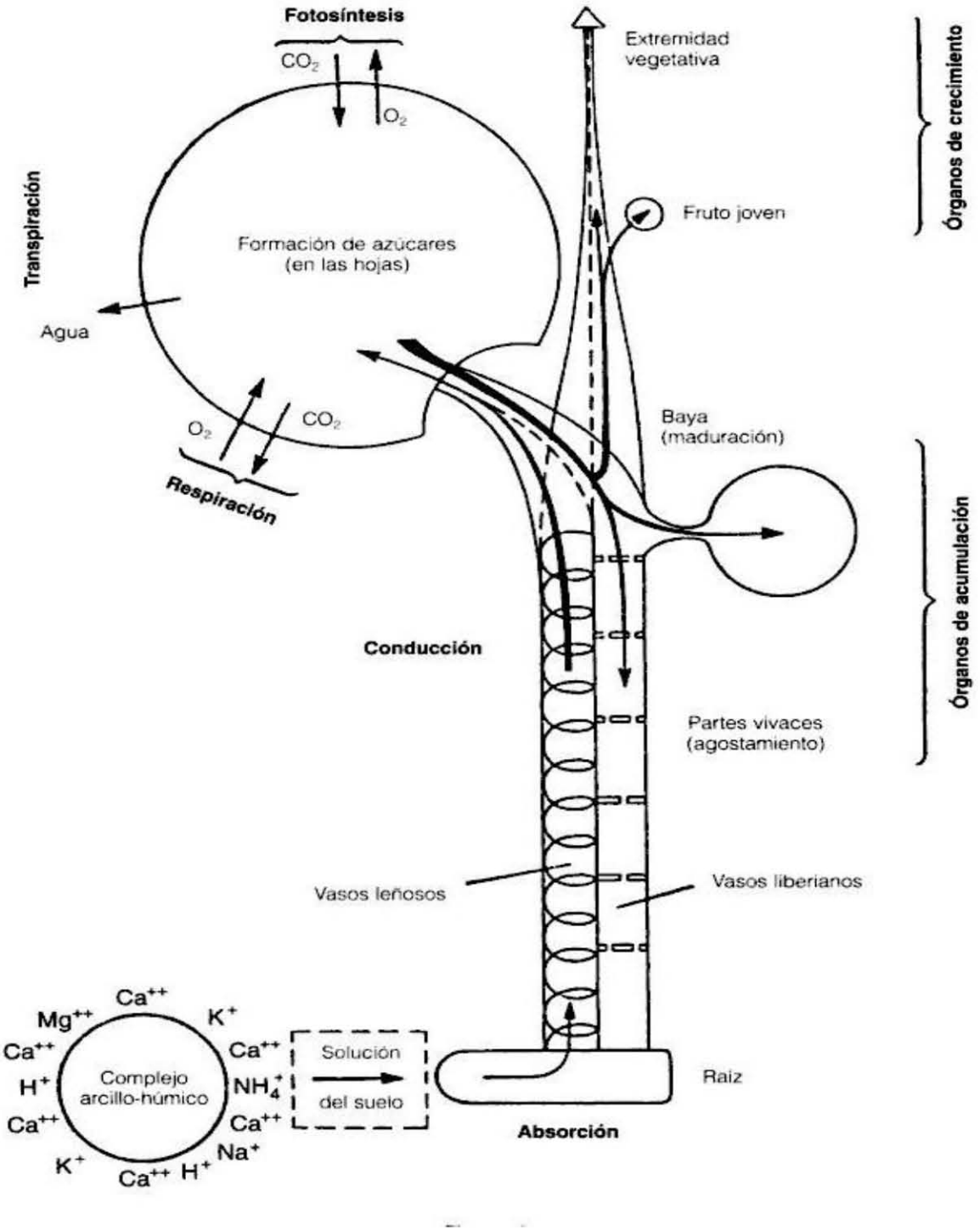


Figura 5. Fisiología de los órganos de la vid.

Racimo: Formado por el escobajo, raquis o raspón, y los granos o bayas. La uva, como todas las frutas, necesita la presencia de hormonas para su crecimiento. Las hormonas de crecimiento pueden proceder de órganos exteriores a la baya, pero la mayor parte viene de las pepitas. (ver fig. 5) (Blouin y Guimberteau, 2012).

El desarrollo de las bayas empieza con la polinización y continúan hasta el estado de madurez. Se traduce en un crecimiento en volumen de las bayas acompañado de una evolución de las características físicas (color, firmeza) y de la composición química de las uvas (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos) (Reynier, 2002).

La acción combinada de la temperatura e iluminación favorecen el crecimiento de las bayas, su volumen final parece estar influido, principalmente por las condiciones de alimentación hídrica entre la floración y el envero. (Reynier, 2002).

Demostrando que la inmersión de racimos en agua produce un aumento de su peso del 4 al 16%; el agua penetra en la baya a través del hollejo. Lluvias continuas, cercanas al momento de la vendimia, sobre racimos compactos, mantienen una fina capa de agua en la superficie de las bayas que podrían incidir en el aumento de volumen de las mismas. (Blouin y Guimberteau, 2012).

La forma y la dimensión de la baya son caracteres específicos; existen variedades con bayas pequeñas (la mayoría de las variedades de vinificación) y variedades con bayas grandes (muchas de las variedades de mesa). Las variedades de vinificación se laceran y la pulpa se hace jugosa en la fase de crecimiento; por el contrario, en las variedades de mesa las membranas celulares de la pulpa quedan intactas y la baya es carnosa. (Reynier, 2002).

1.1.5.Crecimiento de la vid.

En 1995 la FDA, plantea que las regiones áridas con estaciones muy marcadas son las más adecuadas para el desarrollo del cultivo de uva en los trópicos y por eso es necesario producir la uva bajo riego. (Pérez, 2003).

Para el desarrollo de la planta y la maduración de los frutos la mayoría de las variedades requieren una temperatura de aproximadamente 25°C. Una temperatura media mínima de 10°C detiene el crecimiento de la planta de uva. Temperaturas frecuentes por debajo de 12°C son

dañinas para las vides. Sin embargo, las temperaturas elevadas durante la floración favorecen el cuajado de las flores y determinan una gran compactación del racimo y frutos de tamaño pequeño, una temperatura de 40°C daña los frutos, inhiben el color en muchas variedades. (Morales y Morales, 1995).

La luz puede causar algunos cambios asociados con la maduración de los frutos. La exclusión total de la luz retarda la maduración. La luz es indispensable para la formación del color en algunas variedades rojas, aunque en negro no tiene un efecto visible. (Morales y Morales, 1995).

Cuando los racimos maduran, se asiste a un cambio de aspecto de los pámpanos: el color verde desaparece al mismo tiempo que se diferencia netamente la corteza que encontraremos en invierno en el sarmiento. El agostamiento depende la resistencia a las heladas invernales, el vigor de los pámpanos en la primavera siguiente. Hacia el final del agostamiento, las hojas adquieren los colores otoñales y caen, la planta entra en fase de reposo vegetativo. (Reynier, 2002).

En el periodo de maduración – agostamiento de la vid, se debe evitar el crecimiento vegetativo, y preservar la mayor cantidad de masa foliar activa de la acción de las plagas, enfermedades, y de todas aquellas operaciones que la puedan reducir, para favorecer la síntesis de los distintos compuestos, los que se concentran en los frutos confiriéndoles la calidad, y los que forman las reservas de las plantas, necesarias en la brotación del ciclo siguiente. (Albujer, 2012).

1.1.6.Ciclo vegetativo

Su desarrollo se produce a través de los años siguiendo un ciclo vegetativo interanual, pero también en su hábitat natural de clima templado mediterráneo, sigue un ciclo vegetativo anual propio, que no coincide en situaciones tropicales en las que la planta permanece constante en vegetación. (Agudo, 2014).

Desde que se produce la plantación existen cuatro periodos diferenciados en el ciclo vegetativo interanual. (Agudo, 2014).

- **Crecimiento y formación:** donde la planta se desarrolla hasta adquirir su forma adulta, no tiene prácticamente producción y suele durar unos 3 años.

- **Desarrollo de la planta**: esta llega a la forma adulta, producciones crecientes en cantidad y calidad, puede durar entre 7 y 10 años desde la plantación, dependiendo de las condiciones sanitarias, suelo, clima, etc.
- **Periodo productivo**: donde se estabiliza la producción, se puede alargar hasta 30 o 40 años o más contados desde la plantación.
- **Envejecimiento o decrepitud**: disminuye sensiblemente la producción, aunque la calidad puede ir en un leve aumento. Es difícil establecer cuando comienza el envejecimiento, ya que la planta pasa por un periodo de transición antes de comenzar la decrepitud.

En el hemisferio norte, los brotes entran en crecimiento a principios de primavera, terminando el ciclo vegetativo en otoño, mientras que en el hemisferio sur las temporadas se invierten, brotando la viña en otoño y terminando en primavera. En climas tropicales no se produce interrupción del ciclo vegetativo, y el crecimiento de la vid y su fructificación es continuo, llegándose a realizar hasta tres vendimias al año, con ciclos vegetativos de 110 a 130 días. (Ver fig, 6) (Agudo, 2014).

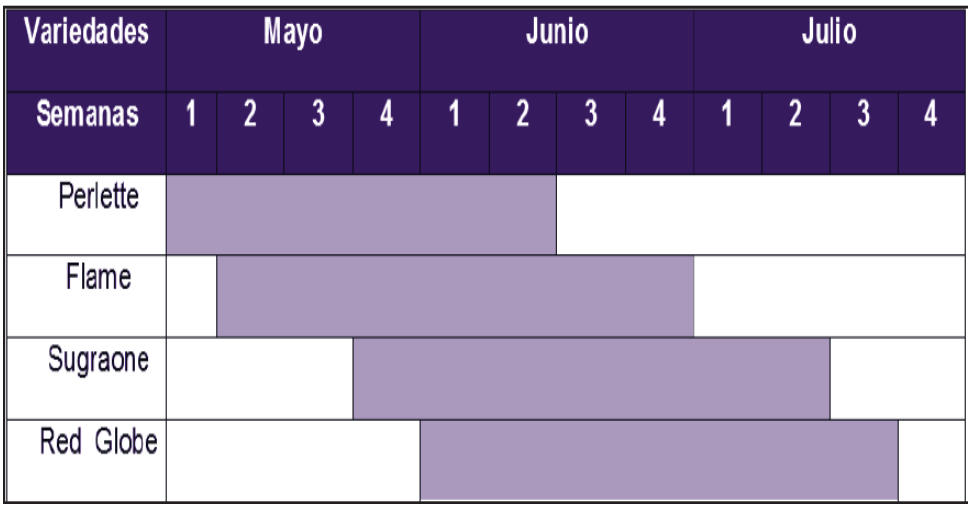


Figura 6. Disponibilidad de las variedades en la temporada Mayo- junio de uva.

1.1.7.Composición química

La composición química de las uvas varía en función de la variedad y el medio ambiente bajo el cual han crecido. Entre los diferentes factores ambientales, la temperatura, la fertilidad de la tierra, la humedad y la luz tienen una marcada influencia, pero de forma general es rica en agua y azúcares y también contienen vitaminas, minerales y otros compuestos saludables que la hacen muy interesante para el consumidor. (Carranza, 2009).

Agua: En ella se encuentran disueltas, en diferentes formas de solución y en suspensión todas las demás materias que forman el mosto. Su proporción es variable y menor en los frutos maduros y procedentes de clima caliente y seco. (Marcilla, 1922).

Azúcares (Dextrosa y levulosa): La proporción de azúcar en el mosto es el primer dato para juzgar de su calidad, pues de ello depende el grado alcohólico del vino que se elabora. (Marcilla, 1922). Son ideales para equilibrar el sabor de los vinos en cuanto a su dulzura, previniendo la eliminación de un sabor amargo que otros componentes del vino pudieran producir. (Heredia, 2004)

Sales: Las sales de los ácidos minerales del vino son los que le otorgan la misma frescura y sabor. (Heredia, 2004).

Los compuestos fenólicos, entre los que se encuentra el tanino, poseen estrecha relación con el color y el sabor del vino. (Heredia, 2004)

Taninos: Estos compuestos son responsables en forma importante para los vinos, dando cuerpo y la estabilidad colorante. Se encuentran en vacuolas tánicas presentes en la zona de hollejo, en las capas que recubren a las semillas. La pulpa rica en taninos en la primera etapa de su formación los pierde por completo al llegar a la madurez. (Peña, 2006).

Ácidos:

a) Ácido tartárico: Es constitutivo de los vinos más jóvenes y sobre todo, de los vinos tintos. Justamente el sabor áspero y fresco que posee este tipo de vino se debe a la presencia de esta sustancia entre sus componentes. (Heredia, 2004)

Tabla 2. Composición nutricional de la uva por cada 100 g de fruta. (Carranza, 2009)

Compuesto	Cantidad
Agua	80.1 – 81.7 g
Calorías	63 -70 cal
Carbohidratos	15.5 – 18.1 g
Cenizas	0.5 g
Grasas	0.1 – 0.4 g
Proteínas	0.7 g
Calcio	4 – 18 mg
Hierro	0.3 – 0.5 mg
Sodio	2 mg
Zinc	0.05 – 0.1 mg
Vitamina A	66 – 73 IU
Vitamina C	4 – 10.8 mg
Vitamina E	0.2 mg
Vitamina K	14.6 µg
Tiamina	0.1 mg
Riboflavina	0.1 mg
Niacina	0.2 – 0.3 mg
Vitamina B6	0.1 mg
Ácido Pantotenico	0.1 mg
Fructosa	7.7 g
Glucosa	7.3 g
Sacarosa	0.4 g
Pectina	280 mg

b) Ácido málico: Está presente en la totalidad del reino vegetal (tanto en las hojas como en los frutos). A raíz de la fermentación de este ácido, se transforma en ácido láctico, lo que le confiere al vino un menor de acidez. (Heredia, 2004)

Beneficios que la uva aporta a la salud:

- Acción antioxidante
- Efectos benéficos contra el cáncer.
- Inhibe la formación de coágulos sanguíneos
- Atenúa el nivel de colesterol LDL (malo)
- Eleva el nivel de colesterol HDL (Bueno)
- Propiedades laxantes, antibacterianas, antivirales.
- Previene las enfermedades cardiovasculares y seniles (Demencias, Alzheimer, etc.) (Heredia, 2004).

1.2. Afectaciones en la vid.

1.2.1. Enfermedades de la vid

El cultivo está expuesto a contraer diversas enfermedades que localizan su acción principalmente en el follaje, los frutos y el tronco, produciendo daños en la producción. En general, la mayoría de las afecciones que dañan la vid son causadas por hongos. En la producción de uvas las enfermedades más importantes son: oídio o quintanal, podredumbre gris, peronóspora, hoja de malvón y virosis. Algunos insectos y los nematodos también pueden causar daños, estos últimos sobre todo en las raíces. (Lanzariní y Mangione, 2009).

Oídio.

Se debe a un hongo llamado *Uncinula necátor*. Ataca principalmente el follaje, brotes y frutos que se cubren de un micelio blancuzco polvoso. En hojas viejas las áreas afectadas se cubren de un vello polvoso pero el daño es superficial. En las hojas jóvenes los ataques son severos. (Morales y Morales, 1995).

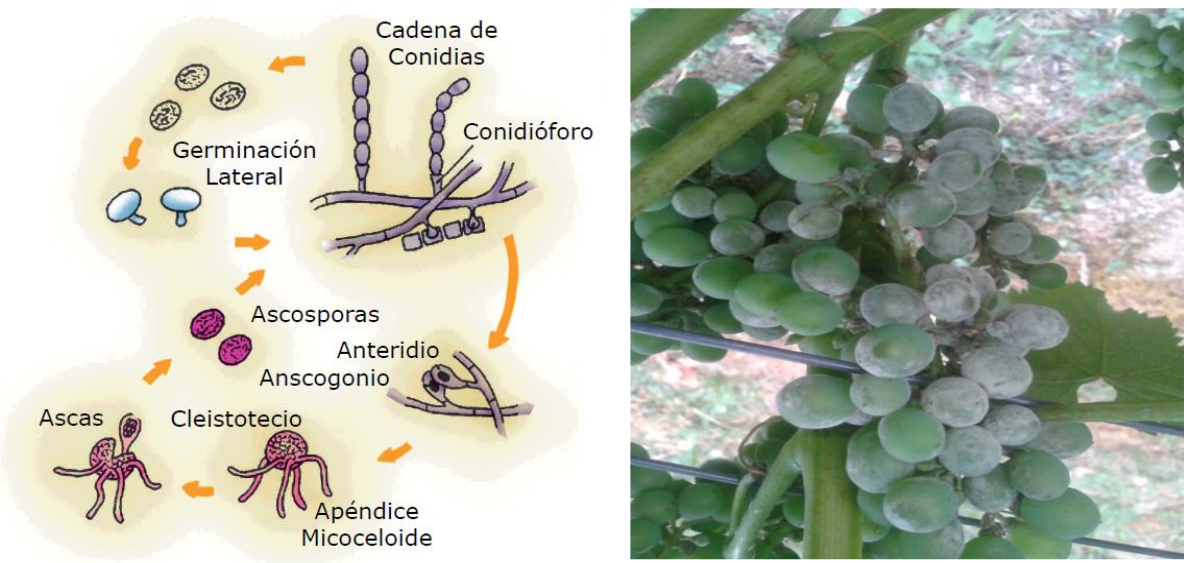


Figura 7. Ciclo de vida de Oídio.

La humedad favorece el desarrollo de esta enfermedad, la temperatura óptima para la germinación de las esporas es de 25 – 28°C, siendo favorecida por la sombra (Ver fig. 7) (Morales y Morales, 1995).

Se recomienda el control preventivo a base de compuestos de azufre. También el uso de fungicidas sistémicos, como triadimifon. Se deben eliminar los restos de poda porque son focos de infección. (Morales y Morales, 1995).

Podredumbre gris.

Producida por el hongo *Botrytis cinérea Pers.* Afecta a la mayoría de las variedades, ocasiona pérdidas entre el 35% y 70% de la producción, daños que varían según las condiciones climáticas del ciclo vegetativo. (Lanzariní y Mangione, 2009).

Figura 8. Podredumbre gris

Como consecuencia de este ataque los granos son invadidos por otros hongos como los *Penicillium* (podredumbre verde), o los *Aspergillus* (podredumbres negras). El hongo se desarrolla bien 15 y 20°C, el agua de lluvia o una humedad superior al 85% crea condiciones muy favorables para el desarrollo de la podredumbre gris (Ver fig. 8). (Reynier, 2002).

Mildiu.

Es una enfermedad producida por el ataque del hongo *Plasmopara vitícola*., se desarrolla sobre todo en las hojas y racimos. Se observa una mancha blanca y brillante, formada por una pelusilla, y acaba por producir la completa desecación de las hojas (Ver fig. 8) (Carrero y Planes, 2008).

El hongo necesita temperaturas de 10-20°C para su desarrollo por lo que lluvias, nieblas y rocíos seguidos por días calurosos, son las condiciones climáticas óptimas para la difusión de la enfermedad (Carrero y Planes, 2008).

La utilización de variedades resistentes sería una solución, pero todas las variedades de *V. vinífera* son sensibles. Las investigaciones en curso buscan la creación de variedades menos sensibles combinando factores de resistencia y los de calidad. Para su control se recomienda aplicaciones preventivas con fungicidas sistémicos (Morales y Morales, 1995).

Figura 9. Enfermedad de Mildiu**.**

1.2.2.Condiciones climáticas.

Heladas.

En las vides, las heladas pueden destruir el brote completo (tallo, hojas, flores y frutos). Los brotes y racimos pueden ser dañados con temperaturas inferiores a -0.5°C. Temperaturas de -3°C o inferiores por pocas horas provocarán la muerte de brotes (Ver fig. 10) (Martínez *et. al.,* 2004).

Figura 10. Quemadura de brotes de vid de mesa.

Como medio preventivo, debemos evitar la instalación del viñedo en zonas propicias a las heladas, asegurar el agostamiento de la madera, luchando especialmente contra los parásitos. (Reynier, 2002).

La utilización de lonas térmicas ayuda a los cultivos a protegerlos de las bajas temperaturas. El uso de plásticos en la agricultura no asegura éxito pleno en el control de heladas. (Martínez *et. al.*, 2004).

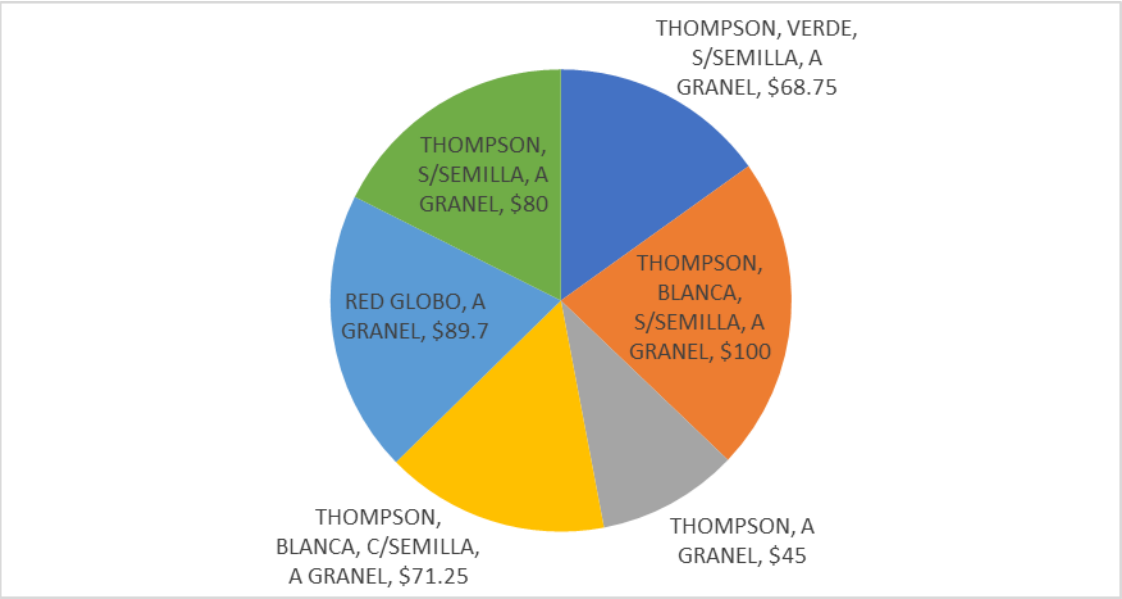
1.3. Demanda de uva a escala nacional.

La industria vinícola en México se integra por los productores de: uva de mesa, uva pasa, jugo de uva concentrado, de vino y los de licores de uva (brandy). En el año 2009, doce estados cosecharon uva de mesa. Tradicionalmente los estados que producen uva son: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas. Sin embargo, de éstos sólo cinco concentran el 95% de la superficie cosechada: Sonora, Zacatecas, Baja California, Aguascalientes y Coahuila (AALPUM, 2009).

La producción nacional de uva de México está compuesta por la producción de uva para uso industrial, uva de fruta y uva pasa. En el país, 70% de la producción de uva de mesa está representada por los productores del Estado de Sonora a través de la Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa (AALPUM). Esta asociación representa el 88% del total de las exportaciones de uva de fruta en nuestro país (AALPUM, 2009).

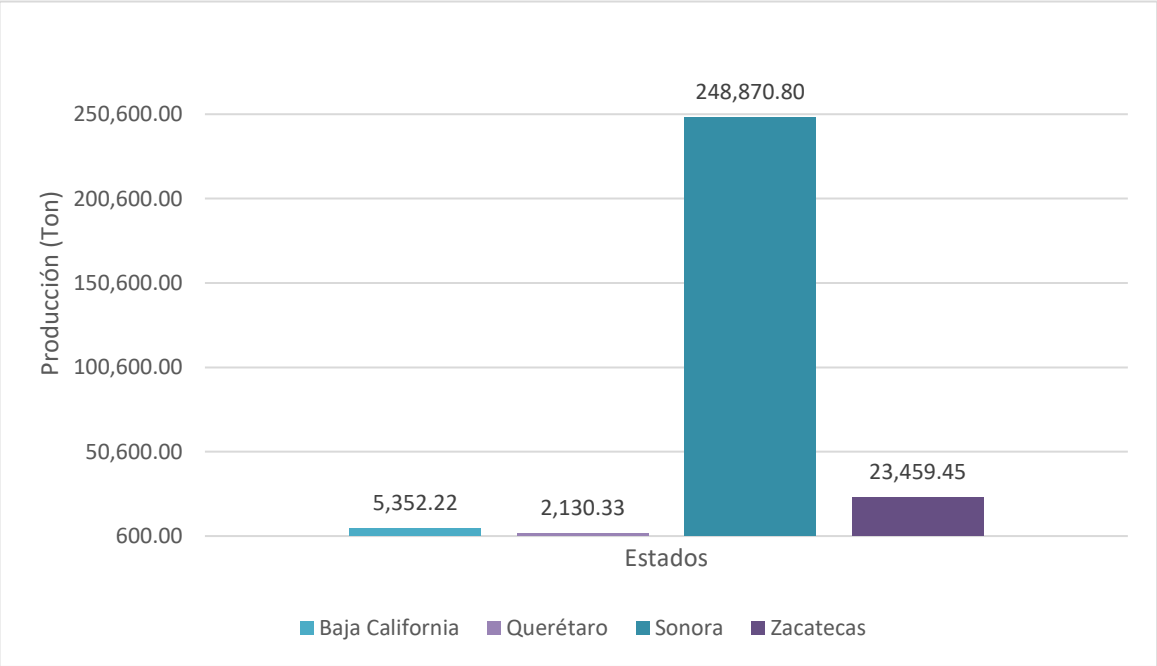
En nuestro país la uva para consumo en fresco se produce principalmente en los estados de Sonora, Zacatecas y Baja California, con un total nacional de más de 256 mil toneladas. La uva mexicana se exporta principalmente a Estados Unidos, El Salvador y Costa Rica, en 2016, las exportaciones superaron en más del doble a las importaciones. El consumo per cápita promedio es de 1.4 kilogramos anuales. (SAGARPA, 2017).

México exporta entre 45% y 60% de su producción (130-175 mil toneladas), que principalmente se compone de uva fresca en un 90% (*flame, superior, perlette y globo*) y uva pasa (1%). Un 80% de las importaciones corresponde a uva fresca y el 20% restante a uva pasa, que proviene principalmente de E.U.A (73%) y Chile (26%). (García, 2014).



Gráfica 1 Precio de uvas por kilo. (Fuente: INEGI, 2017)

La cosecha de uva en el país se realiza entre mayo y diciembre. El 93% del volumen se concentra en 5 meses (mayo a septiembre), periodo en el cual la oferta domestica crece y el precio tiende a disminuir. (García, 2014).



Gráfica 2 Producción de Uva. Fuente: SIAP-SAGARPA, 2017.

En diciembre del 2017, los precios de la uva son altos por demanda de temporada y escases de producción, siendo una de las mas costosas la uva Thompson blanca sin semilla, como se muestra en la Gráfica 1.

Siendo el estado de Sonora el primer lugar con mayor producción de 248,870.80 toneladas en el 2015. Le siguen los estados de Baja California, Zacatecas, Aguascalientes entre otras. Siendo Sonora y Baja california productoras de uvas de mesa y uva vinícola. (Ver gráfica 2) (Fuente: SIAP-SAGARPA, 2015)

1.3.1.Zonas y regiones productoras incluidas (a escala nacional)

La zona vitivinícola mexicana está ubicada entre los 22° y 23° latitud Norte, en el centro-norte del país. Los suelos son muy arcillosos, de mediana a poca profundidad en su mayoría, con gran capacidad de retención de humedad, lo que constituye un aspecto altamente favorable para el desarrollo de las viñas (AALPUM, 2009).

Los primeros plantíos de México fueron en Puebla (Tehuacán y Huejotzingo) después en Querétaro, Aguascalientes, Coahuila y posteriormente en Baja California y en Sonora (Salazar, 2011).

Siendo el Estado de Sonora el que más produce. Este se ubica en el norte de México y es el segundo en extensión territorial. La región la costa de Hermosillo-Pesqueira, la mayor zona productora de uva de mesa del país, con una extensión de 200,000 hectáreas. (AALPUM, 2009).

1.3.2.Análisis de la demanda del mercado internacional

La Unión Europea domina el mercado de producción mundial de uva, abarcando alrededor de 35% de los 75 millones de toneladas anuales que se producen. En años recientes se ha dado un fenómeno de crecimiento de la demanda de importación del producto para el mercado interno, ya que la producción europea es exportada a muchos países fuera la Unión Europea y no acapara las variedades que está requiriendo el mercado. La variabilidad existente de precios dentro de subregiones o países europeos es importante. En Holanda y Bélgica más de 70% de la producción

de frutas y vegetales es comercializada a través de asociaciones de productores; la media Europea es de alrededor de 40% (AALPUM, 2009).

Mundialmente, el consumo anual de uvas de mesa se ha incrementado al pasar de 1.2 kilos por persona en 1970 a 3.5 kilos en 2008. En promedio los grandes países productores exportan entre 20 y 35% de las uvas de mesa a otros países. Los precios de las uvas de mesa son más altos en todas partes del mundo que las uvas utilizadas para procesos específicos, como lo es la creación de vinos y otros licores. Esto se debe a la más alta calidad requerida para comercializar uva de mesa (AALPUM, 2009).

1.4. Industria Vinícola.

Acompañante del ser humano ha sido el vino, desde las civilizaciones antiguas y se pueden mencionar las distinciones hechas por las sociedades griega y romana. El vino es una bebida que contiene más de mil sustancias, la mayoría de las cuales (como las vitaminas o los minerales), provenientes de las uvas (Font *et. al.*, 2009).

Debido a que contiene alcohol etílico, el vino ha pasado por circunstancias difíciles (sobre todo a principios del siglo XX), sin embargo, en la época de los noventa, las personas se preocupaban por dar a conocer los beneficios del vino en la salud del ser humano; sin dejar de mencionar el daño que puede causar beber en exceso. Es una bebida digestiva, que ayuda a relajar, antidepresiva y antiséptica (ayuda a combatir padecimientos infecciosos) (Font *et. al.*, 2009).

1.4.1. Producción internacional de vino.

A partir del año 2000 el número de hectáreas usadas para los viñedos se ha mantenido en poco menos de 8 millones. La Organización Internacional de la Viña y el Vino, estima que el número de hectáreas usadas a nivel mundial para viñedos era de 7, 871,000. El 57.8% se siembra en Europa, 21.7% en Asia, 12.8% en América, 5.1 en África y el 2.6% en Oceanía (Font *et. al.*, 2009). La Organización nacional de la viña y el vino (OIV), calcula que en el 2007 las exportaciones fueron de aproximadamente 91 millones de hectolitros; siendo Europa la que exporta más con un 70.8%, América con 15.4%, Oceanía con 9.5%, África 3.9% y Asia con 0.4%. Los líderes exportadores son Italia, España, Francia, Australia, Chile, Estados Unidos, Argentina, Portugal,

Alemania, Sudáfrica, Moldavia y Bulgaria; quienes exportan en total 83 millones de hectolitros (Font *et. al.*, 2009).

Por otra parte, Se importan 81 millones de hectolitros, Europa con el 74.7%, América con el 17%, Asia 4.7%, África 2.4% y Oceanía 1.2%. Quienes más importan son Alemania, Inglaterra, Estados Unidos, Rusia, Francia, Holanda, Bélgica, Canadá, Suiza, Dinamarca, Suecia y Japón; en el 2007 importaron casi 63 millones de hectolitros (Font *et. al.*, 2009).

1.4.2. Producción nacional de vino.

La industria vinícola mexicana ha crecido en los últimos años, al grado que, según La Asociación Nacional de Vinicultores (2008) indica que apoya en gran medida la economía del país. Según dicho organismo, su valor es de aproximadamente 137 millones de dólares, en donde la mitad de la producción mexicana y el resto se importan de países como Chile, España, Estados Unidos y Alemania (Font *et. al.*, 2009).

En el país existen cerca de 3350 hectáreas destinadas al cultivo de uva para la producción de vino, destacando las que se encuentran en Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro, al producir aproximadamente 27 mil toneladas de uva en cada ciclo agrícola (Font *et. al.*, 2009).

1.5. Organismos Genéticamente Modificados.

Los humanos hemos utilizado a otros seres vivos para satisfacer nuestra necesidad de alimento, salud y vivienda, y en este proceso hemos dañado y abusado del planeta y de su biodiversidad. Además, muchos de los recursos naturales se agotan, la productividad agropecuaria es insuficiente y el explosivo crecimiento de la población mundial impone, año tras año, la necesidad de más alimentos y más medicamentos. De ahí la relevancia que tiene, y tendrá a futuro, el desarrollo de la biotecnología en conjunto con otras tecnologías, como parte de una respuesta responsable a esta problemática (Bolívar, 2011).

La biotecnología moderna incluye un conjunto de metodologías desarrolladas en los últimos años, que posibilitan la manipulación directa del material genético de células y tejidos; este conjunto se denomina Tecnología del ADN recombinante o Ingeniería Genética. La biotecnología moderna se basa en la utilización de organismos vivos cuyo metabolismo y capacidad biosintética

son orientados hacia la fabricación de sustancias específicas o sistemas biológicos con el fin de obtener un producto o un servicio (Marín *et.al.*, 2001).

Los OGM son aquellos en los que el material genético, el ADN, ha sido alterado artificialmente, no por cruzamiento o recombinación natural sino a través de la tecnología del ADN recombinante. Esta metodología permite que genes particulares, seleccionados especialmente, sean transferidos de un organismo a otro (Marín *et.al.,* 2001).

Se han desarrollado diferentes métodos para introducir genes foráneos en plantas. Una característica común es que el ADN transformante tiene que vencer diferentes barreras; primero tiene que entrar a la célula vegetal atravesando la pared celular y la membrana plasmática y posteriormente tiene que llegar al núcleo e integrarse en los cromosomas residentes (Martínez *et.al.,* 2004).

1.6. Controversia por transgénicos

El debate surge del dilema: los alimentos transgénicos aumentan la producción y el valor nutritivo de estos productos, lo cual ayudará a la reducción del hambre en el mundo. Sin embargo, se temen los hipotéticos riesgos a largo plazo que puedan tener su utilización masiva para la salud humana y medio ambiente. Debemos tener en cuenta tanto los beneficios como los riesgos potenciales (Pellegrini, 2012).

Una de las modificaciones es la resistencia de plantas a herbicidas, uno de los beneficios potenciales son la eliminación a la necesidad del tratamiento pre-emergencia. Desde el punto de vista ecológico se ha denunciado los posibles efectos secundarios negativos de contaminación del suelo y agua. Otros defienden la idea de que la resistencia genética a diferentes plagas y enfermedades implicará el menor uso de pesticidas (Lacadena, et. al. 2001).

Es un hecho conocido que lo países que promueven las innovaciones facilitan el otorgamiento de patentes y viceversa. En el caso de OGM es E.U.A donde se otorgan con mayor facilidad. Esta discusión contempla como corporaciones biotecnológicos trasnacionales efectivamente necesitan del acceso a la biodiversidad (Massieu, 2009).

La controversia en México tiene varios aspectos, uno de ellos gira en torno a sí es ético transformar plantas alimenticias, por los riesgos de liberar estas nuevas variedades en el

ambiente. Otro aspecto es el movimiento social donde hay indignación porque la alimentación, la naturaleza y el destino de los agricultores campesino de subsistencia, dependen de poderosas corporaciones trasnacionales, cuyo fin primordial es el lucro (Massieu, 2009).

La industria biotecnológica, organizada en México en el Consorcio AgroBio, presiona constantemente para que se libere la siembra, argumentando que es la solución a los problemas de la agricultura y la alimentación en México. La polémica muestra una arena de disputa donde se confrontan diversos intereses y fuerzas políticas y tiene repercusiones internacionales, por ser México centro de origen del maíz (Massieu, 2009).

1.6.1.Regulación de la bioseguridad en México

En 1999 la ONU se ha reunido en varias ocasiones sin llegar a un acuerdo para regular el movimiento transfronterizo de transgénicos. La elaboración de un protocolo internacional para el movimiento transfronterizo de OGM es uno de los mandatos del convenio de la Diversidad Biológica, nacido en la reunión conocida como Cumbre de la Tierra, en Río de Janeiro en 1992 (Massieu, 2009).

En 2005 se aprobó la Ley de Bioseguridad, con una serie de irregularidades y contradicciones. Hay protestas y está es apodada “Ley Monsanto”. (Massieu, 2009). Esta ley se necesita complementarla, ya que no se verifica la inocuidad de los alimentos, así como a la biodiversidad y al ambiente (Vázquez *et.al.*, 2000).

El 28 de Mayo del 2014, el Diario Oficial presentó lo que es el proyecto de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SAG/BIO-2014, que tiene como objetivo regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de OGM, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana, medio ambiente y a la diversidad biológica, etc. (DOF, 2014).

1.7. Uva Transgénica.

La especie *Vitis vinífera* es la uva de la antigüedad a menudo se menciona en la Biblia. La mayoría de la uva de mesa, el vino y pasas se producen de esta especie, la última se ha originado en las regiones unidas entre el sur del mar Caspio y el Mar Negro, en Asia Menor. A nivel mundial, la vid es el cultivo de mayor importancia económica, entre las especies frutales. Debido a los numerosos usos de su fruto en productora de vino, uva de mesa, frutos secos y compuestos orgánicos, también es el cultivo de fruta más extendida en el mundo. La producción mundial de uvas es actualmente de más de 85 millones de toneladas métricas (Nagata *et.al.*, 2007).

Las restricciones de reproducción de la vid fueron la principal motivación para la transformación de ADN de la uva como un medio para el desarrollo de enfoques transgénicos en este género. En los sistemas de cribado *in vitro* ofrecido un enfoque prometedor para la identificación y aislamiento de los individuos con tolerancia a enfermedades, tras la exposición de diferentes hongos patógenos y bacterias (Nagata *et.al.*, 2007).

1.7.1. Métodos para la transformación genética de la uva

La ingeniería genética, llamada también metodología del ADN recombinante, es un conjunto de herramientas y métodos que permiten la manipulación *in vitro* del material genético de los organismos vivos (Bolívar, 2007).

Esta metodología está sustentada en dos grandes tipos de herramientas celulares. La primera de ellas son las enzimas que utiliza la propia célula en sus procesos internos para el manejo de su material genético. El otro tipo de herramientas son los vehículos moleculares de clonación de ADN, que son moléculas de ADN que permiten la replicación de fragmentos de ácido nucleico incapaces de hacerlo en forma autónoma. La ingeniería genética está también soportada por un conjunto de métodos que permiten aislar, caracterizar y manipular el ADN (Bolívar, 2007).

Estas herramientas son fundamentales para modificar, editar y detectar de manera muy fina y específica el ADN y finalmente, la técnica de reacción en cadena de polimerasa o PCR que es una metodología que permite la amplificación de cualquier fragmento de ADN, generando varios billones de copias idénticas a este fragmento de ADN en pocas horas (Bolívar, 2007).

Un enfoque genómico para descubrir y determinar la función de todos los genes de la vid es la estrategia más prometedora para lograr una comprensión rápida y completa de la biología de la vid. La *Vitis* es muy adecuada para estudios de genómica, que tiene un tamaño de genoma de aproximadamente 500Mbp (Nagata *et.al.*, 2007).

El conocimiento adquirido del proyecto del genoma de la uva promoverá la investigación básica de está en los campos de los procesos biológicos complejos y biología evolutiva de la uva. La investigación genómica *Vitis* está abordando muchos temas de viticultura y enología. El beneficio global de la aplicación de la genómica a la vid será un aumento en la precisión de las prácticas de mejora y viticultura genéticas mediante el establecimiento de correlaciones entre refinados caracteres moleculares y rasgos agrícolas. El fenotipo de una planta cultivada de uva (calidad de la baya, rendimiento, el vigor, la tolerancia al estrés biótico y abiótico) es el resultado de una interacción dinámica y compleja entre el medio ambiente, la gestión de campo y los genes de la variedad. Rasgos considerados de interés fundamental son patógenos y la resistencia al estrés biótico, la inactividad, la calidad de las uvas de mesa y de vino y la reproducción (Nagata *et.al.*, 2007).

La viticultura tradicional de desarrollos actuales está concentrada en la producción de varias enfermedades y resistencia a las plagas. Además de control de la enfermedad, los enfoques biotecnológicos se han centrado cada vez más en los rasgos de fruta, como el contenido de azúcar, color, apirena en uva de mesa y el aumento de rendimiento de fruta. Varios ejemplos notables que describen los últimos productos de la uva genéticamente modificados destinados a la adquisición de resistencia a patógenos o mejorar la calidad de la fruta (Nagata *et.al.*, 2007).

La infección por el virus de la vid puede causar graves pérdidas al reducir sustancialmente el rendimiento, lo que afecta la calidad del fruto y el acortamiento de la vida útil de las plantas en el viñedo. La manipulación genética es una forma atractiva para insertar genes resistentes a virus específicos en cultivares de élite comerciales (Nagata *et.al.*, 2007).

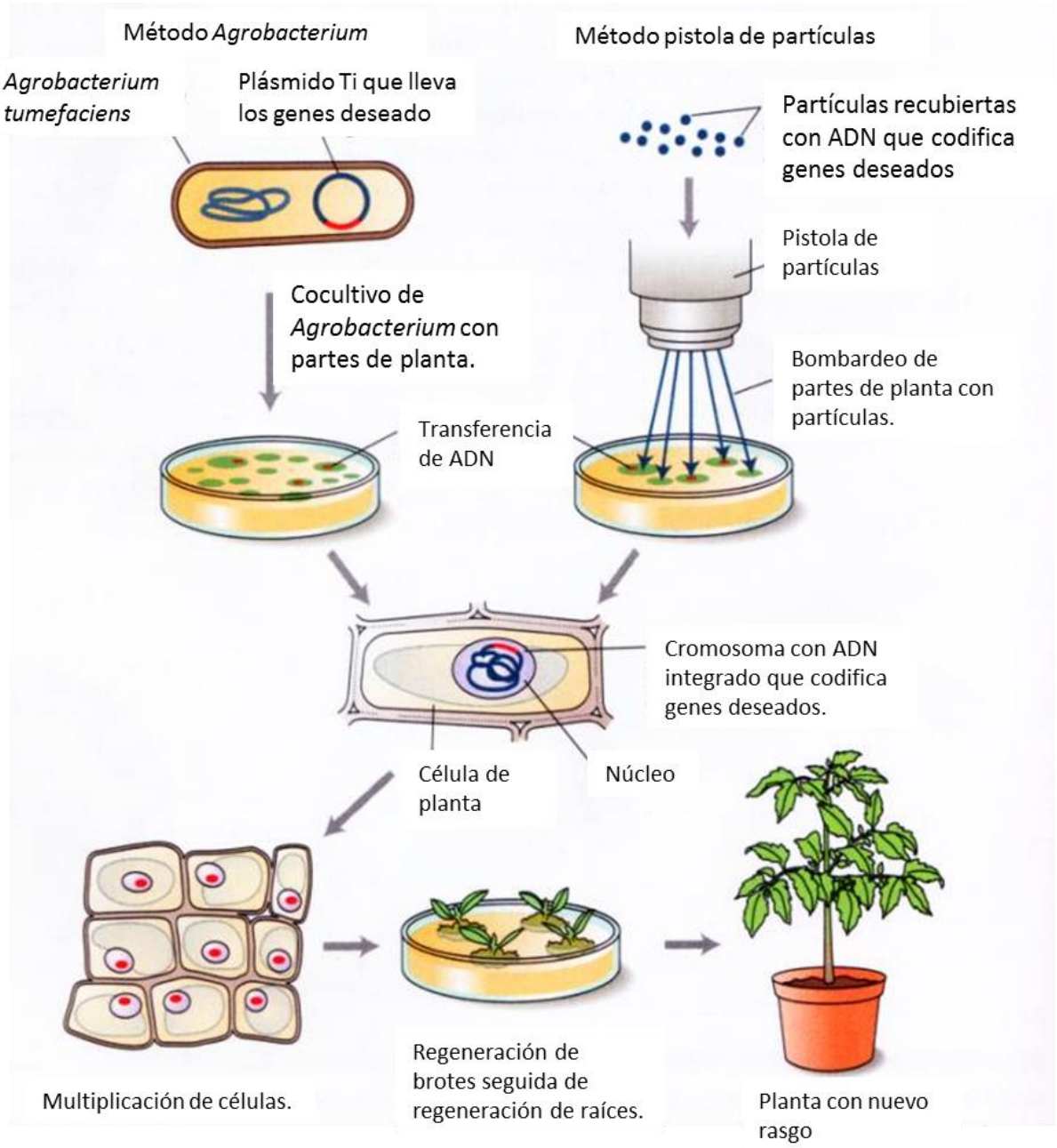


Figura 11 Transformación de plantas por *Agrobacterium.*

1.7.1.1. *Agrobacterium tumenfasis*

Agrobacterium tumefaciens y sus especies relacionadas como *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero, *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en las plantas, durante el proceso de infección introduce en la célula vegetal una parte de su ADN (ADN de transferencia o ADN-T) el cual es integrado dentro del genoma de la planta. Los genes de ADN-T son expresados formando tumores y la síntesis de aminoácidos, los cuales son aprovechados por la bacteria. El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (del inglés "tumor-inducing") que además contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta (Valderrama et. al, 2005).

Algunos o todos los genes bacterianos del ADN-T pueden ser removidos originando vectores desarmados, los cuales pueden transformar células vegetales sin los síntomas generales de la infección bacteriana, por lo tanto, no es patógena ya que no segrega ninguna toxina. El plásmido Ti es un vector que se inserta en las células vegetales mediante enzimas de restricción y ligasas (ver fig. 11) (Valderrama et. al., 2005).

1.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonulceico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad del fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN. (Pérez, 2011).

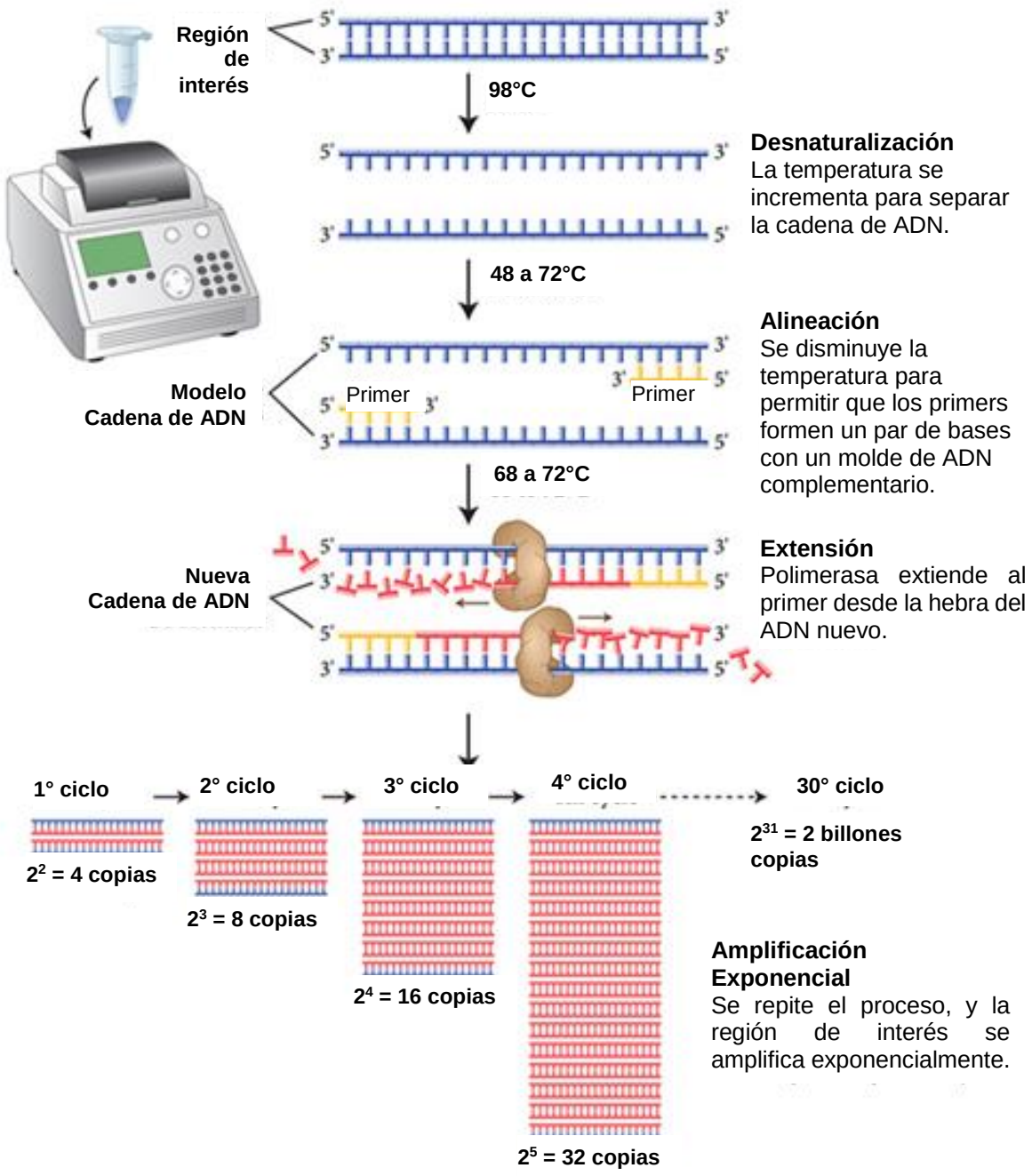


Figura 12 Ampliación de un fragmento de ADN mediante PCR.

La PCR ha permitido la investigación de nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica. (Querci, et. al., 2007).

- Fundamento

Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia en blanco es copiada.

1.8.1.Etapas

La PCR es un proceso que consta de tres etapas:

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso. (Tamay de Dios *et al*., 2013).

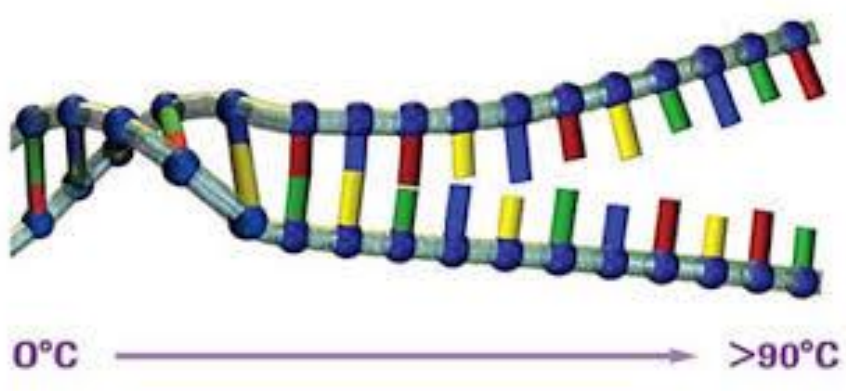


Figura 13. Desnaturalización de ADN.

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura de fusión (Tm) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente. (Tamay de Dios *et al*. ,2013).

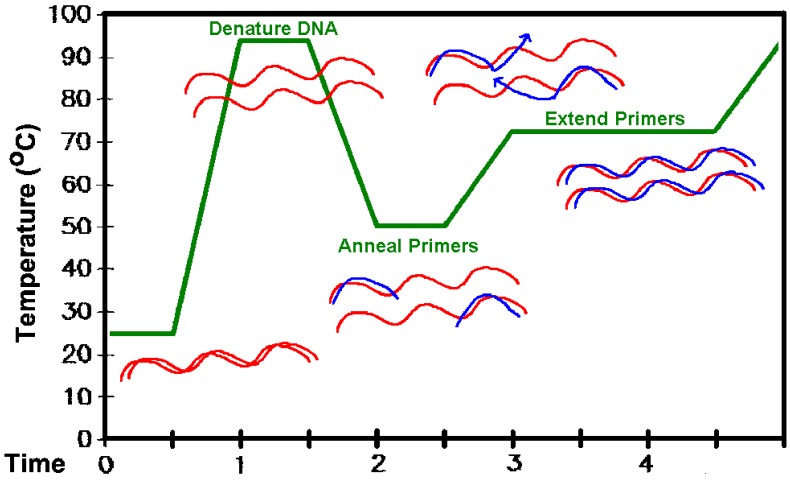


Figura 14. Alineamiento de Primers.

Extensión. En esta etapa, la enzima actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador. (Tamay de Dios *et al*., 2013).

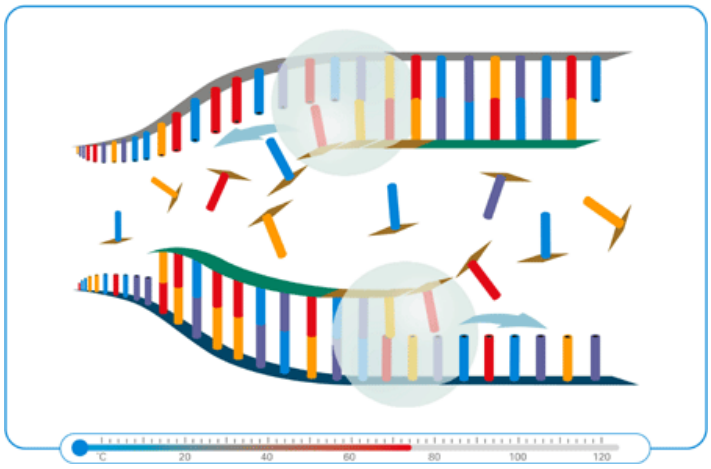


Figura 15. Extensión de cadena de ADN.

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés. El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados (Cortázar y Rincón, 2004).

1.9. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis en gel es una técnica consistente en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada

a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso. (Querci, et. al., 2007).

La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante. (Querci, et.al., 2007).

ADN marcador

La distancia de migración depende del peso molecular del material inicial. Así pues, debe cargarse un marcador de tamaño conocido en las ranuras situadas en los extremos. Generalmente un marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita determinar el tamaño de ADN desconocidos. (Querci, *et.al.,* 2007).

2. Capítulo 2. Metodología Experimental

2.1. Justificación

Las controversias con respecto al uso de organismos genéticamente modificados han ido en aumento, con su mayor uso en los últimos años. Algunos consumidores se oponen a la idea de ingerir frutas que no han sido creadas naturalmente y que posiblemente provoquen algún daño en la salud. Debido a esto, es importante detectar con métodos rápidos los alimentos transgénicos que se están produciendo e importando a México y dar a conocer a los consumidores si la uva es o no transgénica. Por medio del etiquetado en donde deberá identificar con una leyenda que es Organismo Genéticamente Modificado en los alimentos, siendo la responsabilidad de los consumidores de comprarlos o no.

Identificación de uvas comerciales (*Vitis spp.*) genéticamente modificadas (OGM), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

OBJETIVO GENERAL

Analizar uvas (*Vitis spp.*) comerciales en México, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, para demostrar que han sido genéticamente modificadas, siendo un motivo más para que etiqueten los alimentos.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Extraer y purificar el ADN genómico de diferentes variedades de uvas comerciales, mediante la técnica de fenol cloroformo de Sambroock y Russell, para su consecutivo análisis.

ACTIVIDADES PRELIMINARES.

- **Obtener muestras de uvas para su análisis.**
- **Extracción de ADN de las muestras.**
- **Cuantificación de la extracción de ADN por medio de la espectrofotometría.**

OBJETIVO PARTICULAR 2

Diseñar los primers específicos de *Vitis spp.* por medios de recursos bioinformáticos, para la identificación de especie.

ACTIVIDADES PRELIMINARES.

- **Diseñar los primers específicos para *Vitis spp.* con los recursos bioinformaticos.**
- **Calcular la Temperatura de fusión para el programa de PCR.**
- **Evaluar la especificidad de los primers seleccionados.**

OBJETIVO PARTICULAR 3

Demostrar que el diseño de primers de la especie *Vitis spp.* amplifique la zona de interés, mediante la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa, para detectar si existe la presencia de la especie en su estructura de ADN.

ACTIVIDADES PRELIMINARES.

- **Introducir el programa al Thermociclador de acuerdo con la temperatura de fusión de los primers.**
- **Realización de cálculos para hacer la mezcla de los reactivos para PCR Directo.**
- **Ejecución de PCR.**
- **Evaluar el producto a través del gel en electroforesis.**

OBJETIVO PARTICULAR 4

Seleccionar los primers del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y de *Agrobacterium tumefaciens* (TNOs), por medio de investigación bibliográfica, para la identificación de organismos genéticamente modificados.

ACTIVIDADES PRELIMINARES.

- **Búsqueda de artículos donde utilicen los primers específicos para CaMV y TNOs.**
- **Calcular la temperatura de fusión de los primers.**
- **Establecer el programa de acuerdo con el Tm de los primers para su evaluación en PCR.**

OBJETIVO PARTICULAR 5

Evaluar variedades de uvas comerciales en México, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, para conocer si han sido modificados genéticamente.

ACTIVIDADES PRELIMINARES.

- **Introducir el programa al Thermociclador de acuerdo con la temperatura de fusión de los primers.**
- **Realización de cálculos para hacer la mezcla de los reactivos para PCR Directo.**
- **Ejecución de PCR.**
- **Evaluar el producto a través del gel en electroforesis.**

RESULTADOS

Análisis de Resultados → **Conclusiones**

2.2. Descripción del Cuadro Metodológico

Objetivo General: Analizar uvas (*Vitis spp.*) comerciales en México, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, para demostrar que han sido genéticamente modificadas, siendo un motivo más para que etiqueten los alimentos.

Objetivo Particular 1: Extraer y purificar el ADN genómico de diferentes variedades de uvas comerciales, mediante la técnica de fenol cloroformo de Sambroock y Russell, para su consecutivo análisis.

Actividades preliminares:

- Obtener muestras de uvas para su análisis.
- Extracción de ADN de las muestras.
- Cuantificación de la extracción de ADN por medio de la espectrofotometría.

Objetivo Particular 2: Diseñar los primers específicos de *Vitis spp.* Por medio de recursos bioinformáticos, para la identificación de la especie.

Actividades preliminares:

- Diseñar los primers específicos para *Vitis spp.* con los recursos bioinformaticos.
- Calcular la Temperatura de fusión para el programa de PCR.
- Evaluar la especificidad de los primers seleccionados.

Objetivo Particular 3: Demostrar que el diseño de primers de la especie *Vitis spp.* Amplifique la zona de interés, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, para detectar si existe la presencia de la especie, en su estructura de ADN.

Actividades preliminares:

- Introducir el programa al Thermociclador de acuerdo a la temperatura de fusión de los primers.
- Realización de cálculos para hacer la mezcla de los reactivos para PCR Directo.
- Ejecución de PCR.
- Evaluar el producto a través del gel en electroforesis.

Objetivo Particular 4: Seleccionar los primer del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y de *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos), por medio de investigación bibliográfica, para la identificación de organismos genéticamente modificados.

Actividades preliminares:

- Búsqueda de artículos donde utilicen los primers específicos para CaMV y TNOs.
- Calcular la temperatura de fusión de los primers.
- Establecer el programa de acuerdo al Tm de los primers para su evaluación en PCR.

Objetivo Particular 5: Evaluar variedades de uvas comerciales en México, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, para conocer si han sido modificados genéticamente.

Actividades preliminares:

- Introducir el programa al Thermociclador de acuerdo a la temperatura de fusión de los primers.
- Realización de cálculos para hacer la mezcla de los reactivos para PCR Directo.
- Ejecución de PCR.
- Evaluar el producto a través del gel en electroforesis.

2.3. Materiales y métodos.

Material Biológico:

La selección fue de manera aleatoria. Se eligieron uvas de mesa de un centro comercial, mercados urbanos y uva vinícola obtenida de viñedo en México.

En la tabla 6 se muestra la nomenclatura que se dió a las muestras conforme se iban obteniendo.

Tabla 3. Nomenclatura, nombre y origen de muestras de uva.

Nomenclatura	Nombre	Lugar de obtención	Proveniente
1	Uva roja flame seedless	Mercado de San juan	E.U.A
2	Uva red globe con semilla	Mercado de San Juan	E.U.A
3	Uva superior apirena	Mercado de San Juan	E.U.A
4	Uva verde apirena	Mercado urbano Progreso Nal.	México
5	Uva roja apirena	Mercado urbano Progreso Nal.	Chile
6	Uva Black Seedless	Mercado de San Juan	Chile
7	Uva roja con semilla	Mercado urbano Tlahúac	México
8	Uva roja con semilla	Centro comercial B. Aurrera	Chile
9	Hoja de parra	Mercado urbano Tlahúac	México
V1	Uva vinícola “El salvador”	La redonda, Querétaro	México

2.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN de uva de mesa y uva vinícola se realizó utilizando la técnica fenol cloroformo de Sambroock.

Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra (hoja, hollejo, pulpa y semilla) usando detergentes y proteinasa, la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido por la precipitación de ADN con etanol frío.

Metodología:

A continuación, se describe el protocolo con algunas modificaciones al propuesto por Sambrook, 2001:

- Disgregación de la muestra

1. Con la ayuda de un mortero, se trituró la muestra de uva (Pedicel y hollejo).
2. Se pesó de 150 - 600 µg aproximadamente de la muestra en un tubo Eppendorf.

Nota: Debido a los altos pigmentos que contiene la uva negra, se agregó 500 µL de alcohol etílico al 70%, se mezcló suavemente, se dejó 20 minutos a Temperatura ambiente y se retiró.

3. Se adicionaron 1250µL de solución de lisis.
4. Se agitó con vortex hasta visualizar pedazos más pequeños y una mezcla homogénea.
5. Se adicionaron 7µL de enzima Proteinasa K previamente concentrada a 20mg/ml.
6. Suavemente se mezcló el tubo varias veces.
7. Se incubaron los tubos con las muestras a 50°C en Thermomixer por 2 horas.
8. Se debe desactivar la enzima elevando y manteniendo la temperatura en el Thermomixer a 60°C por lo menos durante 1 hora.

   Nota: Se dejaron las muestras a 60 °C por 24 horas.

- Extracción de proteínas y polisacáridos

9. Se adicionó al tubo que contenía la muestra, 0.25 ml de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
10. Se agitaron los tubos varias veces suavemente.
11. Se colocaron en la centrifuga los tubos a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Se separaron las fases, y se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN.
13. Se trasladó la fase recuperada a un tubo Eppendorf nuevo (aproximadamente 500 µL en cada tubo).

- Precipitación de ADN

14. Se adicionaron 1000µL de etanol frío a cada tubo con la muestra.
15. Se mezclaron los tubos suavemente.
16. Se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
17. Se decantó el etanol y se colocó en la incubadora a 37°C, hasta evaporar el etanol.
18. Una vez eliminado el etanol, se adicionó al tubo aproximadamente 50µL de agua libre de nucleasas para re suspender el ADN. Se agitó suavemente el tubo hasta su completa disolución.

El ADN extraído fue congelado a -20 ° C para su almacenamiento, hasta su uso.

2.5. Cuantificación de ADN

Para cuantificar la cantidad de ADN de las muestras, se utilizó un Nanoespectofotómetro, Nano Drop ND-1000.

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta. Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencillo y exacto. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A260/A280 para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0 (Querci, et. al., 2007).

Metodología:

A continuación, se describe el procedimiento para la cuantificación de ADN de las muestras:

1. Se calibró el equipo (AccesoLab NanoDrop ND-1000 A113) colocando 2µL de agua libre de nucleasas en el orificio que se encuentra debajo del brazo.

2. Se baja el brazo del equipo y se abrió en la computadora el programa de NanoDrop, seleccionando la opción para ácidos nucleicos.

3. Se limpió el lector y se colocó nuevamente 2 µL de agua libre de nucleasas para registrarlo como nuestro blanco.

4. Para tomar la lectura de nuestras muestras, se limpió y se adicionarón 2 µL de la muestra de ADN a cuantificar y se correrá el programa.

5. Se registraron los datos proporcionados por el programa en cuanto a la concentración de ADN en una relación de 260nm/280nm.

6. Se limpió adecuadamente el equipo.

2.6. Diseño de primers

Los primer son oligonucléotidos que se utilizan para enmarcar la sección de ADN a amplificar. El diseño de oligonucleótidos es importante para la aplicación de PCR que se requiera. Existen software para facilitar el diseño y la mayoría poseen menús predeterminados. Usualmente un primer de 20 a 24 nucleótidos tiene un buen desempeño. Para elegir el primer adecuado, se deben considerar factores como la temperatura de fusión y alineamiento. (Valencia, 2014).

El primer debe tener las siguientes características:

- Los primers deben tener un Tm de 55-65 °C
- Que corresponda de 45-55% GC
- La temperatura de disociación de un par de primer debe ser aproximadamente la misma.
- Deben evitarse las secuencias complementarias, a fin de prevenir la hibridación entre primers, que impedirán su hibridación con el ADN molde.
- Sin complementariedad en los extremos 3'.

Primers mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica). Para la elección de una secuencia de ADN endógena de la *Vitis,* fue un fragmento de ADN que codifica para proteína seleccionada en la base informática NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) en este caso fue el GEN **TM6** de *Vitis vinífera***.** El procedimiento para el diseño de primers se encuentra en anexo.

Tabla 4. Características de Primer de *Vitis spp.*

Primer	Secuencia 5' – 3'	Tm	Amplificado	Contenido de G-C
Forward	CCAGGAGCTCACCGTTCTTT	62°C	656 pb	55%
Reverse	TGGCCTCAGACCAACCTAAAA	62°C		47%

Se optó por este primer debido a que no hay complementariedad entre ellos, el porcentaje de C-G está dentro del rango de lo recomendable y de igual manera la temperatura de fusión, y sobre todo son específicos para la *Vitis vinífera.*

Para la selección de primers que contiene la secuencia de promotor e iniciador, se realizó por medio del artículo de los autores Karamollaoglu, *et. al.,* (2009).

Debido a que no se cuenta con la temperatura de fusión en el artículo donde se escogieron los primers, es por eso que se utilizó el programa que está diseñado para PCR Directo (Thermo Scientific Phire plant Direct PCR kit).

Tabla 5. Características de primers del iniciador CaMV.

Primer	Secuencia 5' – 3'	Tm	Amplificado	Contenido de G-C
Forward	GCTCCTACAAATGCCATCA	60°C	195 pb	47.4%
Reverse	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	60°C		55%

Tabla 6. Características de primers del terminador TNOs.

Primer	Secuencia 5' – 3'	Amplificado	Contenido de G-C
Forward	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb	55%
Reverse	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA		45%

2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Metodologia:

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se prepararon las muestras de acuerdo al protocolo que precisa el Kit PCR Directo (Thermo Scientific, Phire Plant Direct PCR Kit), con los primers frontal y reverso correspondiente a las muestras en estudio. A continuación, se describe brevemente el procedimiento a seguir para llevar a cabo la amplificación de ADN por medio de la PCR.

Componentes para llevar a cabo la reacción.

Tabla 7. Componentes de PCR Directo

2X Phire plant PCR Buffer	10 µL
Primer R	0.5 µL
Primer F	0.5 µL
ADN	0.5 - 1 µL
Phire hot start II DNA Polymerase	0.4 µL
H_2O	Agregar para 20µL

1. Se hizo el cálculo correspondiente de cada reactivo de acuerdo con el número de muestras que se iban a amplificar.
2. Se realizó la mezcla de dichos componentes en un tubo denominado como “blanco” (omitiendo el ADN y la enzima), se mezcla y se centrifugó por unos cuantos segundos. La mezcla obtenida se dividirá entre el número total de tubos y se repartirá por partes iguales.
3. Se agregó a cada tubo la cantidad de ADN correspondiente, excepto al blanco.
4. Se mezcló en la microcentrifuga y posteriormente se llevaron al termociclador.
5. Se programa el termociclador de acuerdo con las condiciones establecidas para los primers.
6. Se corre la PCR, de acuerdo con el programa para cada primer.

Tabla 8. Programa para PCR Punto final, con primers de *Vitis spp.*

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	5 min.	1
Desnaturalización Alineación Extensión	98°C **62°C** 72°C	5 s 5 s 20 s	40
Extensión final	72°C 4°C	1 min Hold	1

Tabla 9. Programa para primer de CaMV y TNOs que se utilizará para PCR.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	5 min.	1
Desnaturalización Alineación Extensión	98°C **60°C** 72°C	5 s 5 s 20 s	40
Extensión final	72°C 4°C	1 min Hold	1

2.8. Electroforesis en gel agarosa

Metología:

Para analizar los fragmentos obtenidos en la PCR, se lleva a cabo la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separan dichos fragmentos de acuerdo con el tamaño de cada uno. A continuación, se describe brevemente el procedimiento de dicha técnica:

1.- Se pesó la agarosa (0.5-5 gr.) de acuerdo a los pares de bases de la amplificación que se quiere obtener mezclando la agarosa con 50 o 30 ml de buffer TAE según la cámara que se utilice, se dejó calentar hasta ebullición para disolver bien el polvo.

2.- La solución se agita suavemente para evitar la formación de burbujas, y cuando se enfrió (aprox. 60°C) se le agregó una gota bromuro de etidio.

3.-Después se vierte de una sola vez en el contenedor de geles al que ya le colocamos el peine para que se formen los pozos en donde cargaremos las muestras.

4.- En un parafilm depositamos 3 µL de Bromuro de Etidio y 3 µL de Buffer de carga, esto es por cada muestra de PCR; después agregamos la muestra de ADN a cargar aproximadamente 4 µL sobre la gota del buffer y bromuro y mezclamos.

5.- Con una pipeta, se colocó cada muestra en un pozo del gel.

6.- En el primer carril del gel se vierte el marcador de peso molecular, como control para saber el tamaño de las bandas que tendremos.

7.- Cuando el gel está cargado se pon e a 60 volts y se deja correr.

8.- Al terminar se colocó el gel en el foto-documentador para observar; se tomaron las fotos con la cámara en la cual se puede visualizar las bandas de ADN que ya migraron.

3. Capítulo 3. Resultados y Discusión.

Resultado O.P. 1: Cuantificación de ADN

La extracción se realizó por fenol-cloroformo, y cuando se cuantificó por Nanodrop nos arrojaba cantidades desde 1506 hasta 4184.5 ng/µL y la pureza de algunas muestras están por debajo del rango de 1.8-2.0 que de acuerdo a la teoría son cuantificaciones de ADN-ARN respectivamente, se muestra en la tabla 13 los resultados de la cuantificación.

Tabla 10. Cuantificación de ADN.

Muestra	Características	Cantidad ng/µL	260/280
1	Uva roja flame seedless	3933.6	1.84
2	Uva red globe con semilla	4142.3	1.14
3	Uva superior apirena	4184.5	1.11
4	Uva verde apirena	3528.3	1.36
5	Uva roja apirena	2248.5	1.31
6	Uva Black Seedless	2248.5	1.31
7	Uva roja con semilla	4173	1.88
8	Uva roja con semilla	3716.7	1.36
9	Hoja de parra	1506	1.67
V1	Uva vinícola “El salvador”	2189.9	0.80

Los datos que se arrojan en la tabla 13 están por debajo de la relación 1.8 - 2.0 que, de acuerdo con la teoría, están contaminados con proteínas, fenol u otros contaminantes.

Al final de la extracción los polisacáridos fueron visualmente evidentes en el proceso de purificación del ADN notándose su presencia en la textura pegajosa y aspecto viscoso que presentaba en el tubo, los cuales inhibieron la PCR.

Nos enfrentamos a un fruto que contiene polifenoles, polisacáridos y taninos, que pueden ser abundantes durante las diferentes etapas de desarrollo de las hojas. Esto puede afectar los

resultados de la PCR, ya que está requiere de una alta calidad para poder reproducir resultados confiables.

Diferentes autores, mencionan este problema con la extracción. El autor Burçak, *et. al.* (2014) realizó la extracción con fenol-cloroformo, pero con modificaciones en el protocolo, como la utilización de otros reactivos como nitrógeno líquido y CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) que mejoran el rendimiento y la calidad del ADN.

Por la presencia de estos metabolitos presentó dificultades en la PCR con master mix de PROMEGA, inhibiendo la acción de la Taq polimerasa. Por esta razón se consideró utilizar PCR Directo, ya que la enzima de este kit es más eficiente.

Resultado O. P. 2: Especificidad de los primers *Vitis spp.*

En la página de NCBI (National Center for Biotechnology Information), nos reportó que el Gen TM6 de *Vitis vinífera*, que se utilizó para el diseño de primers, no tiene similaridad con otras especies, que son específicos de la *Vitis spp.*

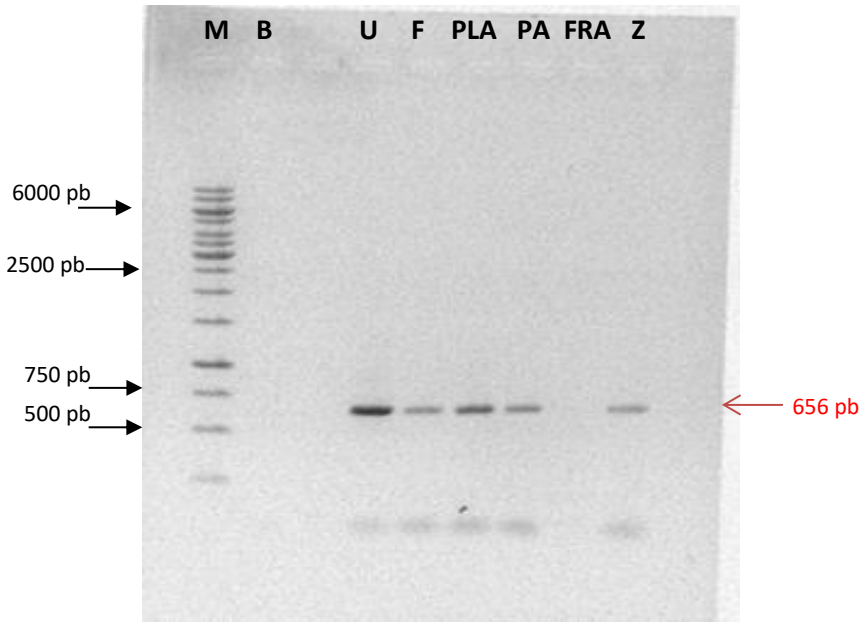


Figura 16. Especificidad de primers *Vitis.* En gel agarosa al 1%, a 90 volts. (M) Marcador de peso molecular de 1kb. En el carril **B** muestra en blanco, no contiene ADN (Control negativo). (U) ADN de uva roja S/s. (F) ADN de Fresa. (PLA) ADN de plátano. (PA) ADN de papa. (FRA) ADN de frambuesa. (Z) ADN de zanahoria.

En la figura 16 se muestra la especificidad de primers *Vitis,* en un gel de agarosa al 1% a 90 volts. En el carril **M** el marcador de peso molecular de 1kb, en el carril **B** muestra en blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril **U** es el ADN de uva roja sin semilla (Control positivo), en el carril **F** el ADN de fresa, en el carril **PLA** el ADN de plátano, en el carril **PA** el ADN de papa, en el carril **FRA** el ADN de frambuesa y por último en el carril **Z** el ADN de zanahoria. Las muestras se corrieron en la PCR con el programa que está en la **tabla 11**, cuando se evaluaron los productos en gel de agarosa al 1%, si amplificaron los primers con el ADN de uva, así también para fresa, plátano, papa y zanahoria. Los primers dieron un buen resultado ya que amplificaron en la zona de interés, obteniéndose un amplificado de 656pb. No se contaminó la reacción ya que, en el carril blanco como control negativo, no hay amplificación. No se esperaba ese resultado ya que la especificidad de estos primers es del 100% para *V. vinífera.,* según BLAST de la página NCBI.

Resultado O. P. 3: Identificación de la uva en muestras comerciales

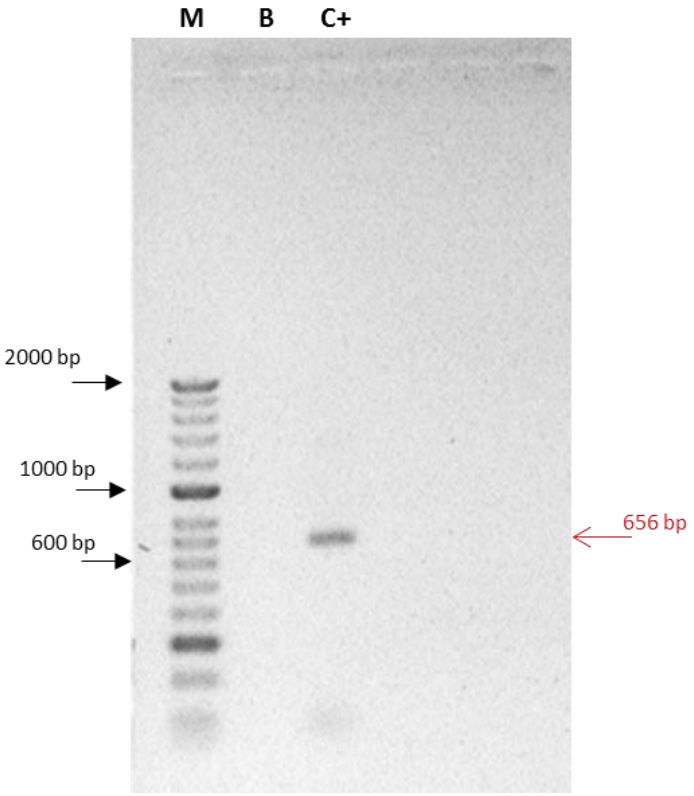


Figura 17 Amplificación de los primers de Vitis en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 pb. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra (Control positivo).

En la fig. 17 se observa la amplificación de los primers *Vitis,* en gel agarosa al 1% a 90v. En el carril **M** es el marcador de peso molecular de 50pb, en el carril **B** muestra en blanco, no contiene ADN (control negativo) y en el carril **C+** la hoja de parra que será nuestro control positivo. Como control positivo se utilizó el ADN de la hoja de parra, amplificando en la zona de interés con 656 pb. El blanco no amplifico ya que no contiene ADN, demostrando que no se contamino la reacción de PCR.

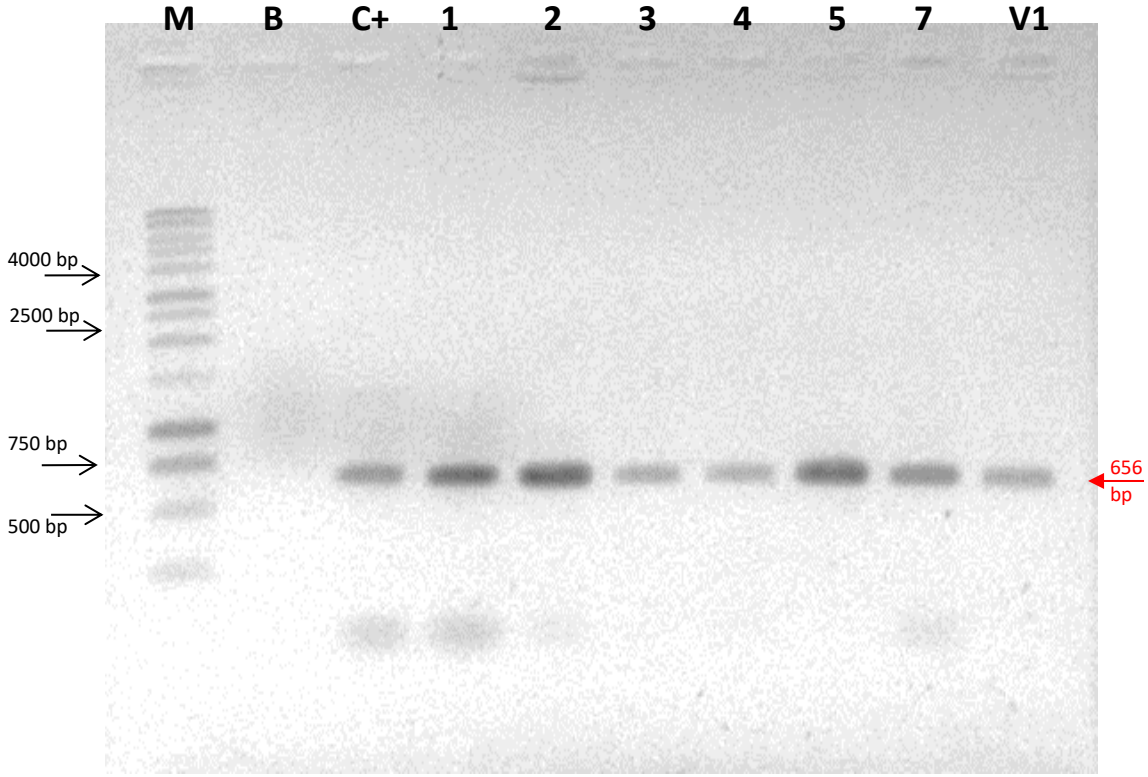


Figura 18. Amplificación de los primers de uva en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 1 kb. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN, (Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra, (Control positivo). En el carril (1) Uva roja S/s, E.U.A. En el carril (2) Uva red globe C/s, E.U.A. En el carril (3) Uva Perlette S/s, E.U.A. En el carril (4) Uva verde S/s, México. En el carril (5) Uva roja S/s, Chile. En el carril (7) Uva roja C/s, México. En el carril (V1) Uva vinícola "El Salvador". México.

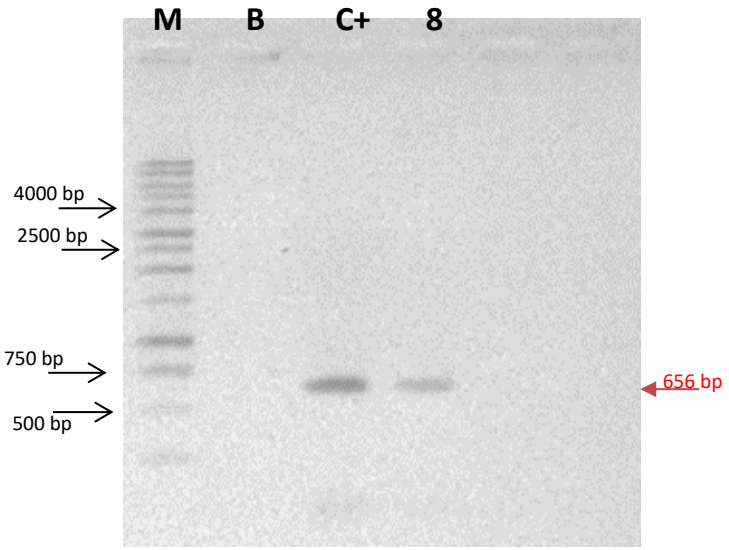


Figura 19. Amplificación de los primers de uva en gel agarosa 1% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 bp. En el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN, (Control negativo). En el carril (C+) Hoja de Parra, Control positivo. En el carril (8) Uva roja C/s, Chile.

La figura 18 contiene: En el carril **M** Marcador de peso molecular, 1 kb, en el carril **B** muestra blanco, no contiene ADN, (Control negativo), en el carril **C+** Hoja de Parra, (Control positivo), en el carril **1** Uva roja sin semilla, E.U.A., en el carril **2** Uva red globe con semilla, E.U.A., en el carril **3** Uva Perlette sin semilla, E.U.A, en el carril **4** Uva verde sin semilla, México, en el carril **5** Uva roja sin semilla, Chile, en el carril **7** Uva roja con semilla, México y en el carril **V1** Uva vinícola "El Salvador", México y la figura 19 en el carril **M** Marcador de peso molecular, 50 bp, en el carril **B** Muestra Blanco, no contiene ADN, (Control negativo), en el carril **C+** Hoja de Parra, Control positivo, en el carril **8** Uva roja C/s, Chile; se muestran las amplificaciones de los primers específicos para *Vitis*, en gel agarosa al 1%. En las dos figuras 18 y 19 se percibe los marcadores de 50 pb, los blancos que no amplificaron lo cual no se contaminaron los productos de PCR y el control positivo con el ADN de la hoja de parra.

Los demás carriles contienen el resultado de PCR para la evaluación de especie de las diferentes uvas, amplificando estas en la zona de interés con 656 pb. Resultando que las muestras contienen el gen de la *Vitis.*

Resultado O. P. 4: Selección de primers transgénicos.

De acuerdo a la investigación bibliográfica se encontrarón los primers para el objetivo de esta investigación, fueron utilizados los mencionados en el artículo "*QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)*", autores Karamollaoglu, et. al. (2009).

Resultado O. P. 5: PCR Directo, con transgénicos primers CaMV y Tnos.

La construcción para la transformación de plantas contiene secuencias de ADN que van a ser insertado en el organismo. Estas secuencias promotoras y terminadoras que permiten que la planta exprese el gen de interés. Una fuente de tales promotores es el virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El promotor 35S de CaMV es funcional en la expresión, por lo tanto, se ha incorporado en numerosas construcciones y usado para producir OGM, con amplificación de 195 pb. (Holden et. al, 2010).

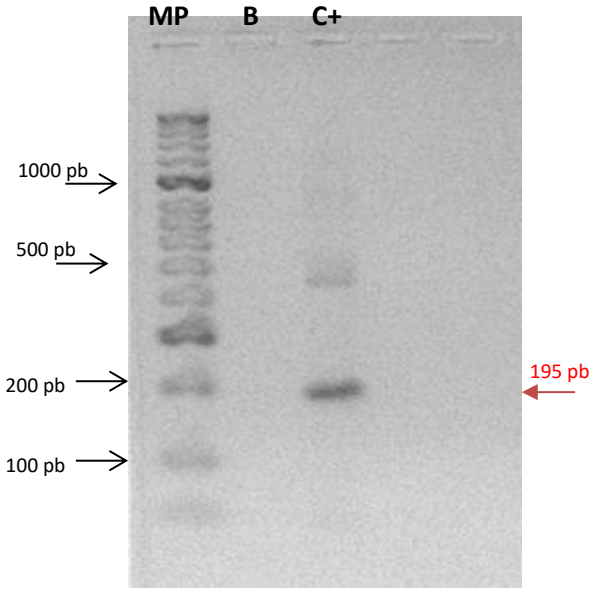


Figura 20. Amplificación de los primer de CaMV en gel agarosa al 2.5% a 85v. En el carril (MP) Marcador de peso molecular de 50 pb. En el carril (B) Blanco (Control negativo). En el carril (C+) Control positivo ADN de Maíz transgénico.

En la figura 20 se muestra la amplificación del primer de CaMV, en un gel de agarosa al 2.5%. Como control positivo se utilizó ADN de maíz transgénico, obteniendo el fragmento de 195 pb. No se contamino la reacción ya que en el blanco como control negativo, no hay amplificación.

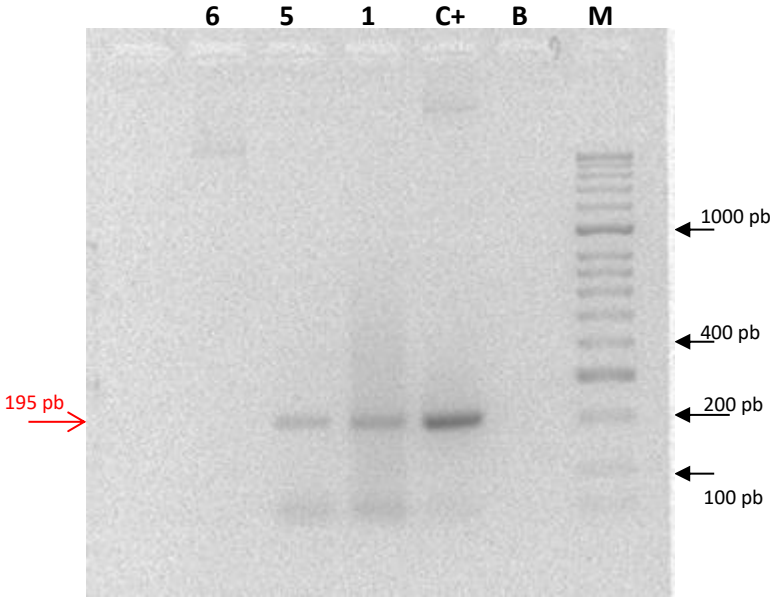


Figura 21. Amplificación de los primers CaMV en gel agarosa al 2.5% a 60v. En el carril (M) Marcador de peso molecular de 50 pb. En el carril (B) Blanco, sin ADN (Control negativo). En el carril (C+) Control positivo, ADN de maíz transgénicos. En el carril (1) Uva roja sin semilla, E.U.A. En el carril (5) Uva roja sin semilla, Chile. En el carril (6) Uva Negra sin semilla, Chile.

La figura 21 es la amplificación de los primers CaMV en gel agarosa al 2.5% a 60v, en el carril **M** Marcador de peso molecular de 50 pb, en el carril **B** Blanco sin ADN (Control negativo), en el carril **C+** (Control positivo) ADN de maíz transgénicos, en el carril **1** Uva roja S/s E.U.A., en el carril **5** Uva roja S/s Chile, en el carril **6** Uva Negra S/s, Chile. La figura 21 demuestra que el blanco no se contaminó en la PCR ya que no hay amplificado, las muestras 1 y 5 (Uvas rojas sin semillas) saliendo positivas ante este gen promotor, provenientes de E.U.A y Chile respectivamente. A su vez la muestra 6 (Uva negra sin semilla) no contiene el promotor CaMV.

- PCR Directo, con transgénicos Primers TNOs

En el sitio de poliadenilación de ARN (que indica el final de la transcripción) de la secuencia de Tnos gen de *Agrobacterium tumefaciens* de la nopalina sintasa ha servido como un sitio de poliadenilación en algunas de las construcciones. (Holden *et. al.*, 2010).

Se realizó la comprobación de primers de TNOs, siendo el control positivo con ADN de maíz transgénico, esperando un amplificado de 180 pb.

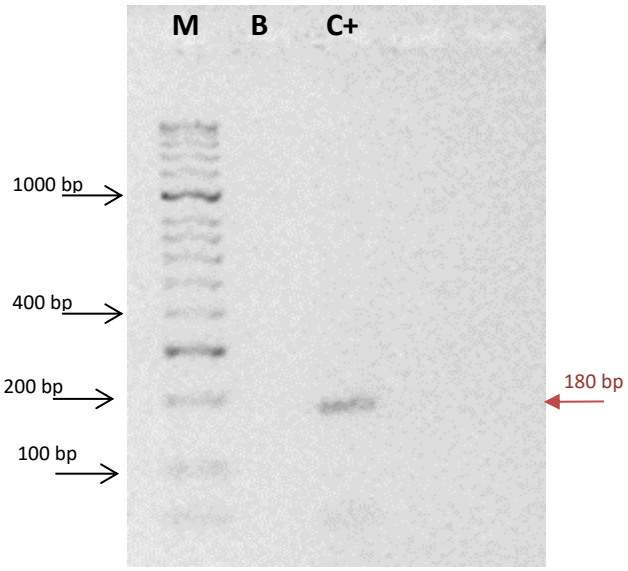


Figura 22. Amplificado de los primers de TNOs en gel agarosa 1.5% a 90v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 bp. EN el carril (B) Muestra Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico, (Control positivo).

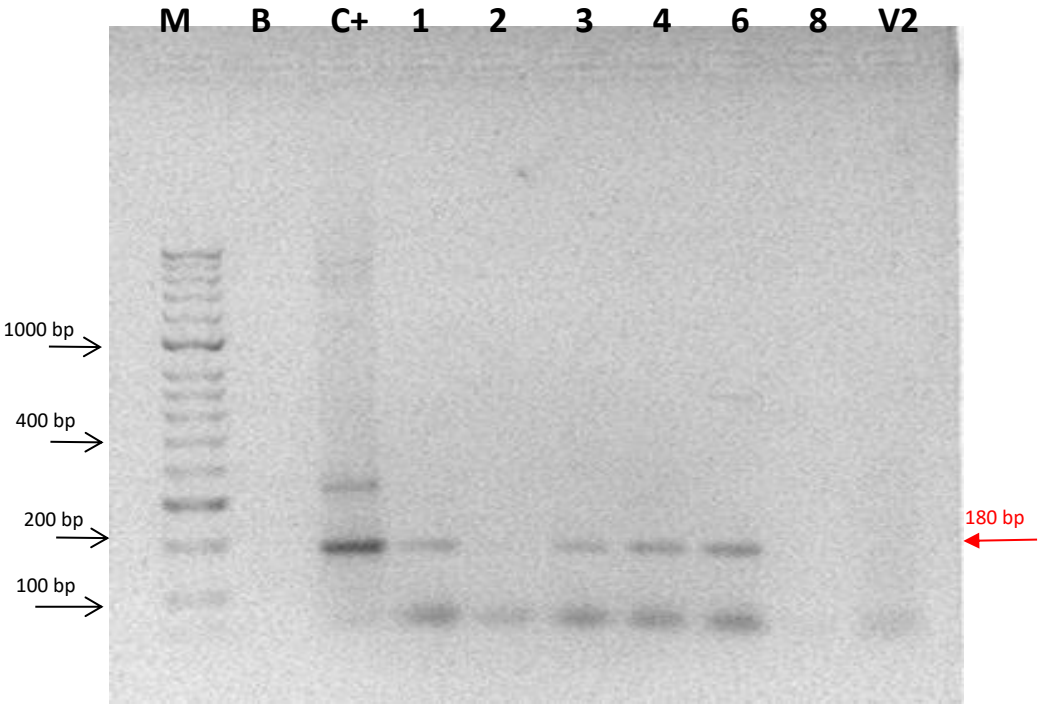


Figura 23. Amplificación de los primers TNOS en gel agarosa 1.5% a 85v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50bp. En el carril (B) Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico (Control positivo). En el carril (1) Uva roja S/s, E.U.A. En el carril (2) Uva red globe C/s, E.U.A. En el carril (3) Uva perlette S/s, E.U.A. En el carril (4) Uva verde S/s, México. En el carril (6) Uva negra S/s, Chile. En el carril (8) Uva roja C/s, Chile. En el carril (V2) Uva vinícola "Ugni Blanc", México.

En la figura 23 se observa la amplificación de muestras de ADN con los primers de TNOS, en gel de agarosa 1.5%, en el carril **M** marcador de 50 pb, en el carril **B** Blanco no contiene ADN (Control negativo), en el carril **C+** Maíz transgénico (Control positivo), en el carril **1** Uva roja sin semilla, E.U.A., en el carril **2** Uva red globe con semilla E.U.A., en el carril **3** Uva perlette sin semilla E.U.A., en el carril **4** Uva verde sin semilla México, en el carril **6** Uva negra sin semilla Chile, en el carril **8** Uva roja sin semilla Chile y en el carril **V2** Uva vinícola "Ugni Blanc", México. Se refleja que no se contaminó el producto pues el control negativo no registro ningún amplificado. Se utilizó ADN de maíz transgénico como control positivo, y los productos de PCR que dieron positivo con los primer TNOs fueron en el carril 1 (Uva roja sin semillas, E.U.A), en el carril 3 (Uva perlette sin semillas, E.U.A), en el carril 4 (Uva verde sin semilla, México) y en el carril 6 (Uva negra sin semilla, Chile), con un amplificado de 180 pb.

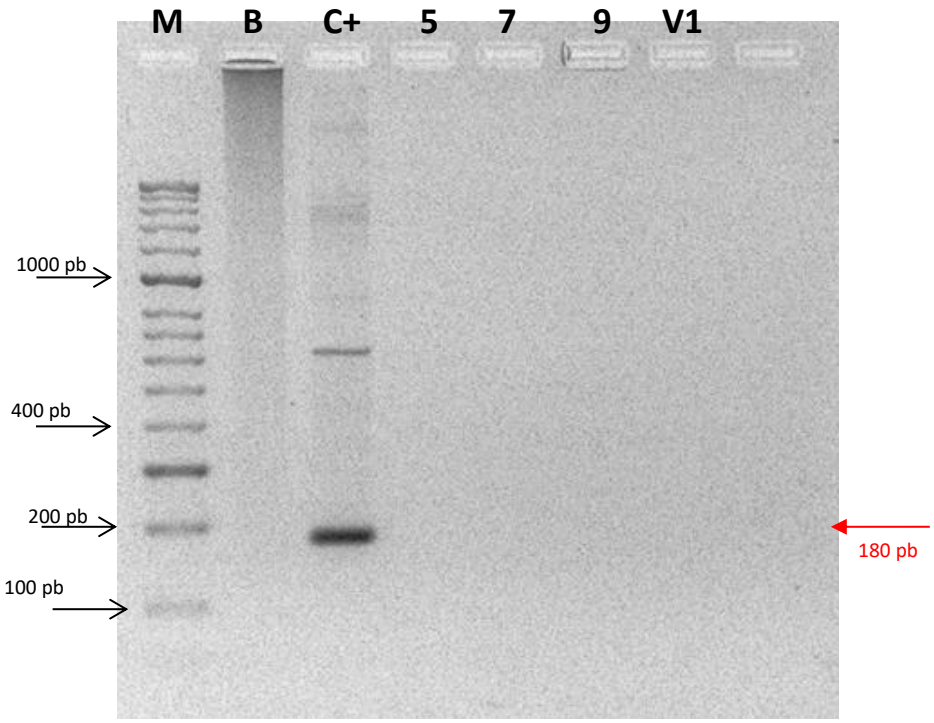


Figura 24. Amplificación de los primers TNOs en gel agarosa 2.5% a 85v. En el carril (M) Marcador de peso molecular, 50 pb. En el carril (B) Blanco, no contiene ADN (Control negativo). En el carril (C+) Maíz transgénico, Control positivo. En el carril (5) Uva roja sin semilla, Chile. En el carril (7) Uva roja sin semilla, México. En el carril (9) Hoja de parra, México. En el carril (V1) Uva vinícola "El Salvador", México.

En la figura 24 se muestra la amplificación de los primers TNOs en gel agarosa 2.5%. Con marcador de peso molecular de 50 pb, como control positivo se utilizó ADN de maíz transgénico. En el carril **B** Blanco, no contiene ADN (Control negativo), en el carril **C+** Maíz transgénico Control positivo, en el carril **5** Uva roja sin semilla Chile, en el carril **7** Uva roja son semilla México, en el carril **9** Hoja de parra México y en el carril **V1** Uva vinícola "El Salvador", México. Se aprecia que no se contaminaron las muestras ya que en el blanco no muestra amplificado. En este gel no se registran amplificaciones que se analizaron con primer TNOs. Autores como Rubio J., et al., 2015., transformaron la uva utilizando otra región del promotor CaMV 35s y el terminador TNOS. Introduciendo genes para hacer resistente a hongos como *B. cinérea* y *Plasmopara vitícola*, para evitar pérdidas de la vid. En este trabajo confirma el uso del promotor y el terminador para su transformación genética, aunque no se sabe que gen utilizaron, esto nos indica que están comercializando uvas transgénicas probablemente con genes de resistencia para hongos.

4. Conclusiones.

La extracción y purificación de ADN de uva mediante el protocolo de Sambrook no fue del todo aceptable debido a que no se lograron eliminar los polisacarídos y los fenoles inhibiendo la enzima Taq Polimerasa y con el kit de PCR Directa que contiene otra enzima más efectivo si se obtuvieron los amplificados de uva.

Cuando se realizó la prueba de especificidad de los primers que se diseñaron para *Vitis*, no fue específico para uva, ya que amplifico para otras especies como fresa, plátano, papa y zanahoria, no se esperaba este resultado ya que según el programa bioinformático de NCBI-BLAST son 100% exclusivos de la uva.

Se realizó análisis a 7 muestras de uva de mesa y una uva vinícola, obteniendo un amplificado de 656pb con los primers diseñados de *Vitis* para todas las muestras.

Los primers de CaMV y TNOs que se obtuvieron del artículo dieron resultados positivos para la determinación de transgénicos.

Por último, se tienen la evaluación de estas mismas muestras con primers CaMV y TNOs, demostrando que las uvas provenientes de E.U.A (uva roja y uva perlette), Chile (uva roja y uva negra) y solo una de México (uva verde) dieron positivas ante el gen promotor y terminador, lo que se comprueba que son transgénicos.

La ley de bioseguridad determina disposiciones donde los OGM importados y nacionales, deben estar autorizados, mencionando que la Secretaria de Salud (SSA) presentará una lista de Autorizaciones para Comercialización e Importación de Organismos Genéticamente Modificados.

Pero en dicha lista no está presente la autorización de la uva para ser comercializada, la SSA debe ser más estricta en estas cuestiones, debido a la gran controversia que existe en nuestros días.

Es necesario que las dependencias correspondientes vigilen y evalúen con mayor eficiencia la entrada de todo alimento genéticamente modificado que ingrese para ser comercializado, exigiendo que se etiquete.

Recomendaciones

Este trabajo como todos requiere de más investigación y tener mejoras logrando que este estudio, este actualizado, debido a esto se recomienda otro diseño de primers de uva que sea específico para la uva, así realizar la especificidad tanto en las uvas, como en los vinos y otros productos de la uva.

También se recomienda realizar PCR a los vinos, así como a los productos provenientes de la uva, con el fin de saber si contienen Organismos Genéticamente Modificados.

Referencias

1. Agudo, L. (2014). SlideShare. *La vid. Organografía y fisiología.* Recuperado el 10 de junio del 2015. De: https://es.slideshare.net/Lorenzo2061969/la-vid-fisiologa
2. Albujer, E. (2012). Chil Vegetal. *Cuaderno de Vitivinicultura Uva de Mesa*. Recuperado el 6 de abril del 2015. Disponible en: http://www.montealegredelcastillo.es/wp-content/uploads/cuadernoviticultura_2.pdf
3. Asociación Agrícola Local de Productores de Uva, (AALPUM), (2009). SAGARPA. *Estudio de demanda de uva de mesa mexicana en tres países miembros de la unión europea, y de exploración del mercado de Nueva Zelandia.* Recuperado el 1 de mayo del 2015. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/ESTUDIO_UVA.pdf
4. Baribault, T., Skene, K., Cain, P., & Steele, N. (1990). Transgenic Grapevines: Regeneration of Shoots Expressing β-Glucuronidase*. Journal of Experimental Botany*, vol. 41, No. 229, pp. 1045-1049.
5. Blouin, J. & Guimberteau, G. (2012). Maduración y madurez de la uva. España. Editorial: Mundi-Prensa. pp.157.
6. Bolívar, F. (2007). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. México; 2° ed, Editorial: El Colegio Nacional. pp. 718.
7. Bolívar, F. (2011). Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. México. Editorial: Academia Mexicana de las Ciencias. pp. 163.
8. Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P., & Thomas, M. (2007). Grapevine (Vitis vinifera L.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 344, pp. 273-285.
9. Burçak, I., Kalkan, H., & Altindisli, A. (2014). Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine. *The Institute of Brewing & Distilling.* Vol. 120, pp. 238-243.
10. Carranza, C. (2009). Influencia del procesado en el valor nutritivo y funcional de la uva blanca. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 187.
11. Carrero, J. & Planes S. (2008). Plagas del campo. España: 13° ed. Editorial: Mundi-Prensa, España. pp. 746.

12. Cortázar, A. & Rincón, E. (2004). Instituto de Biotecnología, UNAM. *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología.* Recuperado el 23 de febrero del 2016; de http://www.ibt.unam.mx/
13. Diario Oficial de la Federal, (DOF) (2014). Especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinado a siembra, cultivo y producción agrícola. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-001-SAG/BIO-2014. Publicado el día 28 de mayo del 2014.
14. Font, I., Gudiño, P., & Sánchez, A. (2009). La industria vinícola mexicana y las políticas agroindustriales: panorama general. *REDPOL*. No. 2. pp. 1-30.
15. García, K. (2014). Financiera Nacional de Desarrollo. Secretaria de Hacienda y Crédito Público (SHCP). *Panorama de la Uva.* Recuperado el 13 de mayo del 2015 de http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Uva%20%28abr%202014%29.pdf
16. Heredia, M. (2004). Descubra el poder de las uvas. Argentina: 1° ed., Editorial: Imaginador; pp. 96.
17. Holden, M., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R., & Jenkins, G. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Anal Bioanal Chem*, Vol. 396, pp. 2175-2187.
18. Karamollaoglu, I., Avni, O.H & Mutlu, M. (2009) QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal,* Vol. 44, pp. 142-150.
19. Lacadena, J., Montoliu, L., Fresno, A., Barahona, E., Torralba, F., & Gracia, D., (2001). Aspectos científicos, jurídicos y éticos de los transgénicos. España, Editorial: Universidad Pontifica Comillas; pp. 168.
20. Lanzariní, M. & Mangione, J. (2009). La cultura de la vid y el vino: La vitivinivultura hace escuela. Argentina: 1° ed., Editorial: Fondo vitivinícola Mendoza; pp. 190.
21. Marcilla, J. (1922). Vinificación en países cálidos. España, Editorial: Calpe; pp. 187.
22. Marín, M., Battistani, J., Sanguinetti. C., & Señorale, M. (2001*).* Organismos Genéticamente Modificados: reflexiones desde el sur. Uruguay, Trilce; pp. 161.
23. Martínez, M., Cabrera, J., & Herrera, L. (2004). Las plantas transgénicas: una visión integral. *Redalyc*, Vol. 2, p. 29.

24. Massieu, Y. (2009). Los cultivos transgénicos en el mundo: situaciones y perspectivas. *Nueva época*, vol. 59, pp.217-243.
25. Morales, P., & Morales, G. (1995). Cultivo de la uva. República Dominicana: 2° ed. Editorial: Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc.; pp. 29.
26. Nagata, T., Lörz, H., & Wildholm, J. (2007). Biotechnology in Agriculture and Forestry. *Springer*, vol. 5, p. 189-202.
27. Nicolás, D. (2008). Influencia de diferentes factores agrologicos y tecnológicos sobre la mejora de la calidad de los vinos tintos de Bobal. Tesis Doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad politécnica de Valencia, España; pp. 187.
28. Reardon, J. & Troxler, S. (2007). North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services (NCDA & CS), *Uvas***.** Recuperado el día 25 de abril del 2015 en http://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/documents/Uvas.pdf
29. Pellegrini, P. (2012). Transgénicos: ciencia, agricultura y controversias en Argentina. Argentina: 1° ed., Editorial: Universidad Nacional Quilmes; pp. 363.
30. Peña, A. (2006). Grupo de Investigación Enológica. *En la calidad de uvas y vino. Los taninos y su importancia.* Recuperado el día 18 de abril del 2016 en http://www.gie.uchile.cl/publicaciones/index.html
31. Pérez, A. (2011) Universidad Politécnica de Valencia. *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Recuperado el 17 de septiembre del 2016 en https://riunet.upv.es/handle/10251/10700
32. Pérez, Y. (2003). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). *El cultivo de la Vid. Perspectivas Actuales*. Recuperado el 13 de abril del 2015. Disponible en: http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1057/cuf0020s.pdf
33. Reynier, A. (2002). Manual de viticultura. España: 6° ed., Editorial: Mundi-Prensa; pp. 520.
34. Rubio, J., Montes, C., Castro, A., Álvarez, C., Olmedo, B., Muñoz, M., Tapia, E., Reyes, F., Ortega, M., Sánchez, E., Miccono, M., Dalla, L., Martinelli, L., Malnoy, M., & Prieto, H. (2015). Genetically enginerered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Transgenic Res*, vol. 24, pp. 43-60.

35. Salazar, M. (2011). Proyecto experimental de levadura W0992-LSA *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, México. pp. 66.
36. Sambrook, J., & Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. E.U.A.: 3° ed.; Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp. 1 a 79-97.
37. Querci, M., Jermini, M., & Van den Eede, G., (2007*).* Manual del participante. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Italia, Editorial: Organización Mundial de la Salud Oficina Regional comisiones europeas; pp. 249.
38. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, vol. 2, pp. 70-78.
39. Valderrama, A., Arango, R., & Afanador, L. (2005). Transformación de plantas mediada por agrobacterium. Ingeniería genética natural aplicada. *Rev Facultad Nacional de Agronomía*, vol.59, pp. 2569-2585.
40. Valencia, L. (2014). Diseño de primers. En Revisión Actualizada de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis para Licenciatura Bioquímica Diagnóstica. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México; pp. 107.
41. Vázquez, V. (2011). Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa. Modelo de la Agricultura Moderna en México en el Siglo XXI. México, Editorial: Fundación Produce Sonora, A.C.; pp. 92.
42. Vázquez, V., Ducoing, E., Chapa, R., Romero, E., & Velázquez, G. (2000*).* Ley de Bioseguridad*. Crónica legislativa*, vol.13, pp.60-61.
43. ViVai Cooperativ Rauscedo (ViVai). (2013). ViVai. *Catálogo general de las variedades y los clones de uva de vino y de mesa.* Recuperado el 11 de junio del 2016 en http://www.vivairauscedo.com/en/catalogo
44. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Recuperado el 11 de febrero de 2018 en https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/este-fin-de-ano-como-de-costumbre-una-uva-un-proposito?idiom=es

Anexo

Diseño de primers para la uva se realizó por medio de recursos bioinformáticos, la página es la siguiente (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

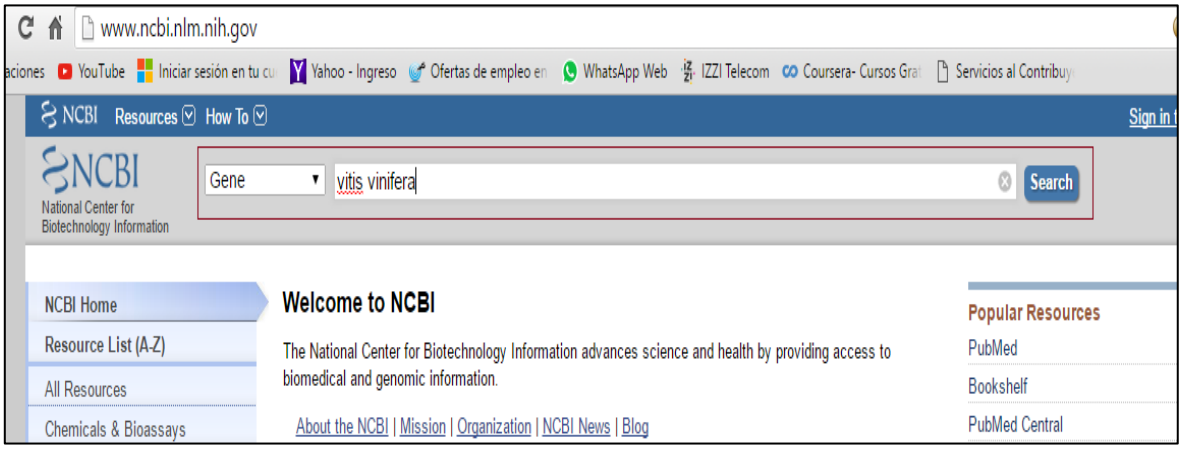


Figura 25 Captura de pantalla de página de NCBI para la obtención de primers.

Colocando en el recuadro la opción de GENE, y en el otro recuadro el nombre científico del producto, en este caso se colocó el de *Vitis Vinífera.* Que es la variedad más conocida. Después de esto le damos en buscar.

Aparecen bastantes genes de donde escoger, para reducir la lista se seleccionó el TM6 es un gen relacionado con una de las proteínas en la flor de la *Vitis*

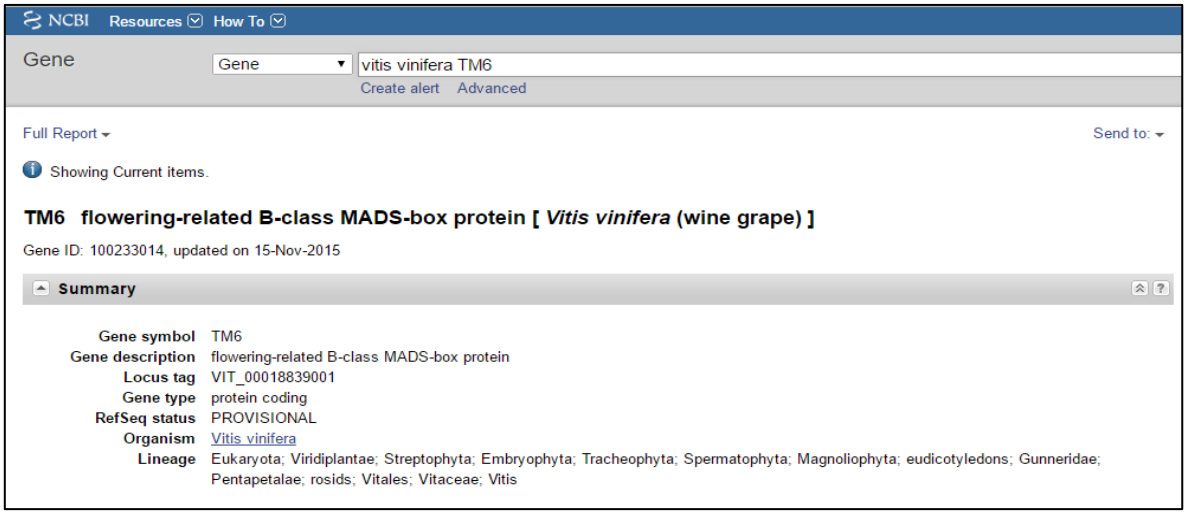


Figura 26 Captura de pantalla, selección del gen de *Vitis.*

Para la selección de primers, seleccionamos la opción de Genbank. Nos lleva a otra ventana como se muestra en la fig. 27.

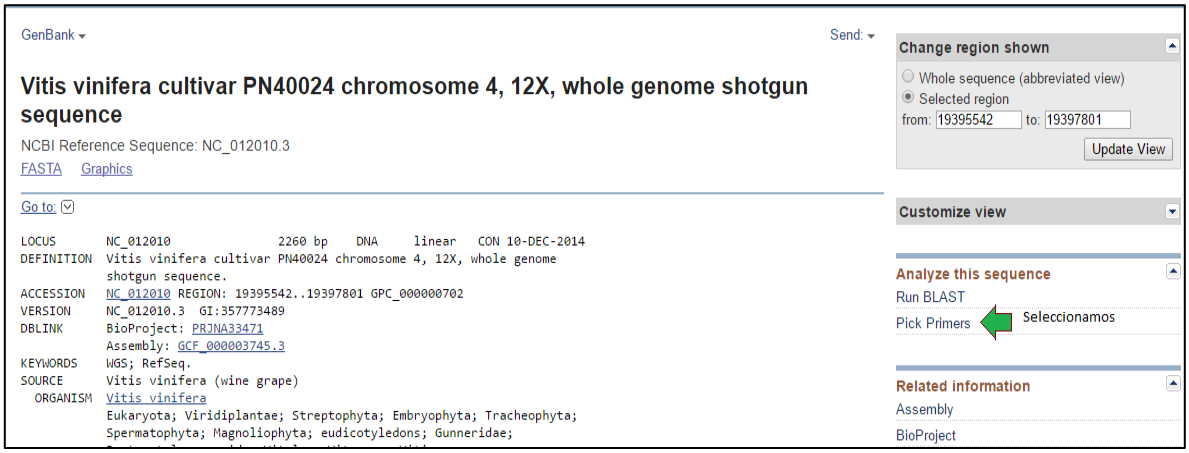
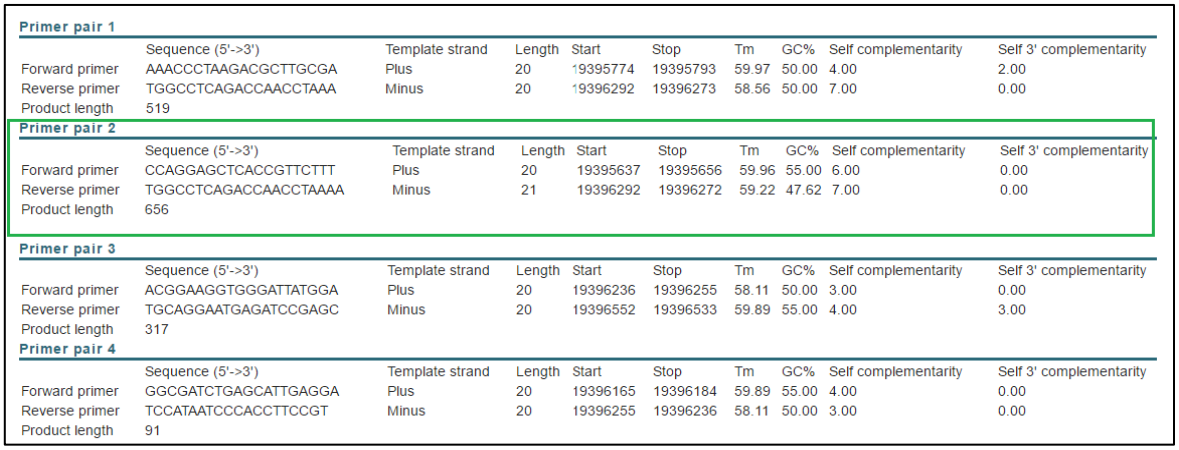


Figura 27 Captura de pantalla, de página para la elección de primers.

Seleccionamos Pick Primers como se muestra en la fig. 27. En la próxima ventana damos click en Get Primers.



Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAACCCTAAGACGCTTGCGA	Plus	20	19395774	19395793	59.97	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	TGGCCTCAGACCAACCTAAA	Minus	20	19396292	19396273	58.56	50.00	7.00	0.00
Product length	519								

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCAGGAGCTCACCGTTCTTT	Plus	20	19395637	19395656	59.96	55.00	6.00	0.00
Reverse primer	TGGCCTCAGACCAACCTAAAA	Minus	21	19396292	19396272	59.22	47.62	7.00	0.00
Product length	656								

Primer pair 3

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACGGAAGGTGGGATTATGGA	Plus	20	19396236	19396255	58.11	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	TGCAGGAATGAGATCCGAGC	Minus	20	19396552	19396533	59.89	55.00	4.00	3.00
Product length	317								

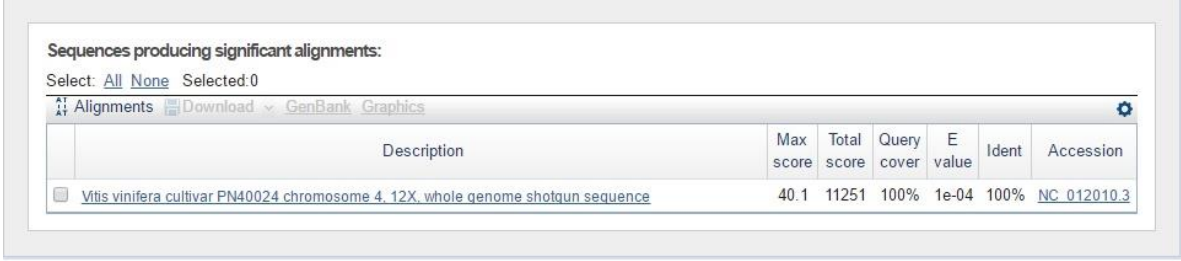
Primer pair 4

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCGATCTGAGCATTGAGGA	Plus	20	19396165	19396184	59.89	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	TCCATAATCCCACCTTCCGT	Minus	20	19396255	19396236	58.11	50.00	3.00	0.00
Product length	91								

Figura 28 Captura de pantalla, de elección de la pareja de primers.

En este paso arroja varias opciones, escogiendo la segunda opción, ya que cumple con los requisitos y no tener problemas en la PCR. No tiene complementariedad en 3', la cantidad de G y C no excede al 60%.

Se tiene que confirmar que el par de primers que se eligió, no tenga complementariedad con otras especies. Así que damos click en la opción Run BLAST, se palomea "Aling two or more sequences", colocando previamente en el primer recuadro la secuencia de primer, en el segundo recuadro colocamos el numero GI y por último damos click en BLAST.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Vitis vinifera cultivar PN40024 chromosome 4, 12X, whole genome shotgun sequence	40.1	11251	100%	1e-04	100%	NC_012010.3

Figura 29 Captura de pantalla, secuencia especifica de *Vitis.*

Como se muestra en la figura 29, la secuencia del primer F tiene complementariedad al 100% con la *Vitis vinífera.* Resultando que este primer solo amplificará para *Vitis vinífera.*